

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/57, 5/08	A1	(11) 国際公開番号 WO99/51752	
		(43) 国際公開日 1999年10月14日(14.10.99)	
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01701</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月31日(31.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/101821 1998年3月31日(31.03.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小沢和春(OZAWA, Kazuharu)[JP/JP] 池田幸弥(IKEDA, Sachiya)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Sizuoka, (JP) 田平 武(TABIRA, Takeshi)[JP/JP] 〒207-0002 東京都東大和市湖畔2-1074-47 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
(54)Title: CELL LINE NOT EXPRESSING β -SECRETASE ACTIVITY			
(54)発明の名称 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株			
<p>(57) Abstract</p> <p>A cell which produces a β-amyloid precursor protein, expresses the α-secretase activity and does not express the β-secretase activity in the absence of any stimulus but expresses the β-secretase activity under a stimulus. This cell is useful in cloning a DNA encoding a protein having the β-secretase activity.</p>			

(57)要約

β -アミロイド前駆体蛋白質を産生し、 α -セクレターゼ活性を発現し、且つ無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しないが刺激下では β -セクレターゼ活性を発現する細胞。 β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAのクローニングのために有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストラリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SC シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL スロヴァキア
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN シネラ・レオネ
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SN セネガル
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	SZ スワジランド
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TD チャード
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TG トーゴ
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TJ タジキスタン
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア	TZ タンザニア
CA カナダ	HU ハンガリー	ML マリ	TM トルクメニスタン
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MN モンゴル	TR トルコ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CH スイス	IL イスラエル	MW マラウイ	UA ウクライナ
CI コートジボアール	IN インド	MX メキシコ	UG ウガンダ
CM カメルーン	IS アイスランド	NE ニジェール	US 米国
CN 中国	IT イタリア	NL オランダ	UZ ウズベキスタン
CR コスタ・リカ	JP 日本	NO ノルウェー	VN ヴイエトナム
CU キューバ	KE ケニア	NZ ニュージーランド	YU ユーゴスラビア
CY キプロス	KG キルギスタン	PL ポーランド	ZA 南アフリカ共和国
CZ チェコ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	ZW ジンバブエ
DE ドイツ	KR 韓国	RO ルーマニア	
DK デンマーク			

明 細 書

 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株

発明の分野

本発明は、 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株に関する。
また、本発明は β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株を用いた
 β -セクレターゼをコードするcDNAのクローニング方法に関する。

背景技術

アルツハイマー病は、進行性の中樞神経系の変性疾患であり、神経細胞外に沈着する老人斑や神経細胞内の神経原線維変化を病理学的特徴とする痴呆症である。特に、老人斑はアルツハイマー病とダウン症候群においてのみ広範にみられ、疾患特異性が高い。アルツハイマー病では老人斑の量と痴呆が相関していることが知られている (Cummings, B.J. and Cotman, C.W. Lancet (1995) 346, 1524-1528)。

老人斑の主な構成成分としてアミノ酸39-42 個のアミロイド ペータ ペプチド(A β) が同定された (Genner, G.G. and Wong, C.W. Biochem, Biophys. Res. Commun. (1984)120, 885-890)。さらに A β の前駆体として β -アミロイド前駆体蛋白質 (β -amyloid p recursor protein, APP) がクローニングされた (Kang, J. et al., Nature (1987) 325, 733-736)。APP は膜貫通部位を一箇所持つ、タイプI の膜蛋白であり、選択的スプライシングによりアミノ酸695、751 及び770 個からなるそれぞれAPP695、APP751及びAPP770の蛋白質をもたらす。A β はAPP のC 末端近くに位置する。A β のN 末端から28位のアミノ酸まではAPP の膜貫通部位の外側に、A

β の29位のアミノ酸からC 末端まではAPP の膜貫通部位内にある。

APP 遺伝子の変異が家族性アルツハイマー病において見出された (Goate, A. et al., Nature (1991) 349, 704-706、Mullan, M. et al., Nature Genet. (1992) 1, 345-347、Hendriks, L. et al., Nature Genet. (1992) 1, 218-221)。その変異の位置は $A\beta$ のN 末端近傍またはC 末端近傍あるいは $A\beta$ の内部に位置している。したがって、APP からの $A\beta$ の生成や脳内での $A\beta$ の沈着がアルツハイマー病の発症に深く関与することが考えられている。

APP の代謝経路には少なくとも2 つの違う経路が存在することが知られている (Estus, S. et al., Science (1992) 255, 726-728)。第一は、APP695の612 位のアミノ酸Lys と613 位のアミノ酸Leu の間で切断される代謝経路である。この代謝経路では $A\beta$ ペプチドの内部のアミノ酸16位のアミノ酸と17位のアミノ酸間で切断され、 $A\beta$ の一部を含むAPP の分泌型N 末端フラグメント ($sAPP\alpha$) を生ずる。この代謝経路に係わるプロテアーゼ活性を α -セクレターゼ活性とよぶ。

第二は、APP695の596 位のアミノ酸Met と597 位のアミノ酸Asp の間と、APP695の638 位のアミノ酸Ala と639 位のアミノ酸Thr の間で切断される代謝経路である。この代謝経路では $A\beta$ の前後の位置で切断され、 $A\beta$ を含まないAPP の分泌型N 末端フラグメント ($sAPP\beta$) と $A\beta$ が生成され、 $A\beta$ よりC 末端側のフラグメントが膜上に残される。 $A\beta$ のN 末端側を切断するプロテアーゼ活性を β -セクレターゼ活性とよび、 $A\beta$ のC 末端側を切断するプロテアーゼ活性を γ -セクレターゼ活性とよぶ。

いくつかの培養細胞系 (teratocarcinoma P19 cell、embryonic kidney 293 cell) において、この2 つの代謝経路により $sAPP\alpha$ と $sAPP\beta$ とがともに分泌されることが報告されている (Libin, H. et

al., J. Biol. Chem. (1996) 271, 30929-30934)。 β -セクレターゼ活性及び γ -セクレターゼ活性を介した第二の代謝経路により $A\beta$ が生成することより、アルツハイマー病の発症機序の解明や治療薬の開発を進める上でこの代謝経路を研究することは大切であると考えられている。

これまでに、APP の2 つ代謝経路に係わるプロテアーゼは何ら同定されていない。APP を $A\beta$ のN 末端付近で切断する活性を示す酵素として、キモトリプシン様プロテアーゼ (Nelson, R. B. et al., J. Neurochem. (1993) 61, 567-577) や、カテプシンD (Ladror, U.S. et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 18422-18428) などが報告されているが、 β -セクレターゼの実体は未だ解明されていない。

これまでに報告された細胞株は、いずれも α -セクレターゼ活性及び β -セクレターゼ活性をともに有するが、 α -セクレターゼ活性のみ有し、 β -セクレターゼ活性を有さない細胞株は知られていなかった。

発明の開示

本発明は、 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株を提供しようとするものである。本発明はまた、 β -セクレターゼ遺伝子をクローニングする方法を提供しようとするものである。

すなわち、本発明は、(A) (1)APP を産生し、(2) α -セクレターゼ活性を発現し、且つ (3)無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株を提供する。本細胞株は、好ましくは刺激下で検出可能な β -セクレターゼ活性を発現する。本細胞株は、好ましくは動物細胞株である。本細胞株は、より好ましくは哺乳動物細胞株である。哺乳動物としては、好ましくはヒトである。本細胞株は、好

ましくは巨核芽球系細胞由来である。

本発明はまた、(B)(1)(A)の細胞株にDNAライブラリーを導入し、(2)DNAを発現させ、(3) β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択し、そして(4)選択された細胞から β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法を提供する。導入するDNAライブラリーは、好ましくはcDNAライブラリーである。cDNAライブラリーは、好ましくは哺乳動物細胞由来cDNAライブラリーである。また、cDNAライブラリーは、好ましくは脳由来cDNAライブラリーである。

本発明はまた、(C)(1)無刺激下で(A)の細胞からDNAを調製し、(2)刺激下で(A)の細胞からDNAを調製し、(3)(1)で得られたDNAに存在せず且つ(2)で得られたDNAに存在するDNAクローンを得、(4) β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法を提供する。調製するDNAは、好ましくはcDNAである。

本発明はまた、(D)上記(B)または(C)に記載のクローニング方法によって得られる β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを提供する。

図面の簡単な説明

図1は、 α -セクレターゼ、 β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼのAPPに対するプロテアーゼ活性を模式的に示す。上向きの黒三角印は切断部位を示す。

図2は、巨核芽球系細胞の培養上清中のsAPPについて、ウェスタン分析を行った結果を示す図である。縦軸の数値は分子量を、矢印

はsAPPの位置を表わす。

図3は、ホルボールエステル刺激した巨核芽球系細胞の培養上清中のsAPPについて、ウェスタン分析を行った結果を示す図である。AはMK/AP8細胞の結果を、BはMK/NL細胞の結果を示す。縦軸の数値は分子量を表わす。

図4は、SH-SY5Y細胞の培養上清中のsAPPについて、エンザイムイムノアッセイを行った結果を示す。縦軸は450ナノメートルの吸光度を、横軸は培養上清の希釈倍率を表わす。

図5はホルボールエステル刺激した巨核芽球系細胞の培養上清中のsAPPについて、エンザイムイムノアッセイを行った結果を示す。縦軸は450ナノメートルの吸光度を、横軸はホルボールエステル刺激の日数を表わす。

発明の実施の形態

本発明は、(A) (1)APPを産生し、(2) α -セクレターゼ活性を発現し、且つ(3)無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株に関する。本発明の細胞株は、無刺激の状態では β -セクレターゼ活性を発現しないが、分化誘導剤、例えばホルボールエステル、インターロイキン-3(IL-3)、レチノイン酸等で刺激すると β -セクレターゼ活性を発現する。刺激された本発明の細胞株は、検出可能な β -セクレターゼ活性を発現する。また、本発明の細胞株は γ -セクレターゼ活性を発現していてもよい。

本発明の細胞株は、動物等に由来する細胞株であるが、好ましくは動物細胞株である。動物細胞株としては、好ましくは哺乳動物由来の細胞株である。哺乳動物としては、好ましくはヒト由来細胞株である。本発明の細胞株は、上述した性質を有する限りいずれの器官、組織、臓器由来であってよいが、好ましくは巨核芽球系細胞由

来である。

なお、本発明の細胞株の性質を有する巨核芽球系細胞株MK/AP8は、平成10年（1998年）3月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-6287として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明の細胞株は天然にAPPを産生してもよいし、遺伝子工学的に操作されたことによりAPPを産生してもよい。本発明の細胞株は、好ましくは遺伝子工学的に操作されてAPPを産生する細胞株である。

本細胞株が産生するAPP(β -アミロイド前駆体蛋白質)は、選択的スプライシングにより、主に全長が695、751又は770からなるそれぞれAPP695、APP751及びAPP770をもたらすことが知られている。本発明の細胞株は、 $A\beta$ のアミノ酸配列を含有する限りいずれのAPPを産生するものであってもよい。APPとして、例えば695個のアミノ酸残基からなるAPP695のアミノ酸配列および対応する塩基配列を配列番号：1に示し、そのアミノ酸配列のみを配列番号：5に示す。APP695は、625位のアミノ酸Glyから648位のアミノ酸Leuまでが膜貫通領域である。

APPは一部の家族性アルツハイマー病(familial Alzheimer's disease, FAD)の発症に関連する点突然変異(FAD変異)を有することが知られている。FAD変異としては、APP695の場合、FAD二重変異として595位のアミノ酸LysがAsn、596位のアミノ酸MetがLeu、FAD変異として642位のアミノ酸ValがPhe、GlyまたはIleのいずれか、及び $A\beta$ の内部のFAD変異として617位のAlaがGlyに変化している。しかしながら、本発明の細胞株が産生するAPPとしては、これらの全て又は一部の変異を有するAPPであってよい。

本発明において、本発明の細胞株が産生するAPPは、 α -セクレターゼ活性によりsAPP α を生成し、刺激された状態で発現する β -セクレターゼ活性によりsAPP β を生成する生物学的活性を有する蛋白質である。したがって、本発明の細胞株が産生するAPPは、配列番号：1又は5に示すアミノ酸配列において18位のアミノ酸Leuから695位のアミノ酸のAsnまでのアミノ酸配列を有し、且つAPPの生物学的活性を有する蛋白質であれば、いかなるものであってよい。なお、配列番号：1又は5において、1位のアミノ酸Metから17位のアミノ酸Alaまではシグナル配列である。また、APPは、配列番号：1において18位のアミノ酸Leuから695位アミノ酸のAsnまでのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するAPPであってよい。

APPは、配列番号：1又は5において591位のアミノ酸Ileから648位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列を有していればその生物学的活性を示すと考えられる。したがって、本発明に使用されるAPPは、配列番号：1又は5において591位のアミノ酸Ileから648位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列を含み、かつ18位のアミノ酸Leuから590位のアミノ酸Glu及び649位のアミノ酸Metから695位のアミノ酸Asnまでのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するAPPであってよい。また、APPは配列番号：1又は5において、1位のアミノ酸Metから17位のアミノ酸Alaまでのアミノ酸配列又はこのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列がN末端に付加していてもよい。

さらにAPPは、その生物学的活性を有する限り、配列番号：1又

は5 において591 位のアミノ酸Ile から648 位のアミノ酸Leu までのアミノ酸配列に対する1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するAPP であってよい。

これらのAPP は、他の膜蛋白質とAPP のキメラ構造のアミノ酸配列を有していてもよい。なお、配列番号：1 又は5 に示すAPP695の597 位のアミノ酸Asp から638 位のアミノ酸Ala までの42アミノ酸残基からなるアミノ酸配列は A β に該当する。

あるアミノ酸配列に対する1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acid s Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

本発明の細胞株が産生するAPP は、由来する種、それらを産生する宿主及び／又は精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖付加の有無や糖鎖付加の位置、糖鎖の構造、リン酸化状態及び／又はジスルフィド結合の有無が異なる。しかしながら、本発明の細胞株が産生し得る限り、いかなる構造を有するAPP であってよい。APP が由来する種としてはヒトが好ましい。

本発明の細胞株が産生するAPP はまた、他のペプチド又はポリペプチドと融合した上記APP であってよい。これら融合ポリペプチドを作製する方法は、すでに公知の手法を用いることができる。APP との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、本発明の細胞株が産生する限りいかなるペプチド又はポリペプチドであ

ってよい。

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。またポリペプチドとしては、例えばGST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。市販されているこれらをコードするDNAを融合させたものを用いることができる。

本発明の細胞株が産生するAPPをコードするDNAとしては、配列番号: 1 に示す塩基配列の148位の塩基Aから2235位の塩基Gからなる塩基配列が挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPPをコードするDNAとしては、各々配列番号: 1 に示す塩基配列を有するDNAであれば、いかなる由来のDNAであってよい。このようなDNAとして、例えばジェノミックDNA、cDNA、合成DNAが挙げられる。これらは、種々の細胞、組織又は臓器あるいはヒト以外の種から得られたcDNAライブラリー、ジェノミックライブラリーから得られたDNAであってよい。

本発明の細胞株が産生するAPPをコードするDNAは、上述のように遺伝子組換え技術を用いて単離することができる。例えば、組換え蛋白質は、本明細書に記載されたAPPの遺伝子の塩基配列をそれらを発現する細胞、組織、又は臓器からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることができる。

具体的には、APP を発現する細胞、組織、又は臓器から、その遺伝子をコードする mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159) 等により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全 RNA から mRNA を精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて遺伝子の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業製) 等を用いて行うこともできる。また、cDNA の合成および増幅を行うには Marathon cDNA Amplification kit (CLONTECH 製) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 8998-9002、Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を調製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。目的とする DNA が得られれば、これを発現ベクターへ組み込む。

本発明の細胞株が産生する APP をコードする DNA としては、配列番号：1 に示す塩基配列に対しハイブリダイズし、且つその生物学的活性を有する APP をコードする DNA であってもよい。APP をコー

ドするDNA がハイブリダイズする条件としては、適度なストリンジェンシー条件下においてハイブリダイズするDNA が挙げられる。

このようなハイブリダイズ条件としては、例えば低ストリンジェンシーな条件が挙げられる。低ストリンジェンシーな条件としては、例えば42℃、5 × SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムにより与えられる洗浄条件である。より好ましくは、高ストリンジェンシーな条件が挙げられる。高ストリンジェンシーな条件としては、例えば60℃、0.1 × SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムにより与えられる洗浄条件である。ある蛋白質をコードする塩基配列に対し、適度な条件でハイブリダイズするDNA がコードする蛋白質がその蛋白質と同じ生物学的活性を有することはすでに知られている。

本発明の細胞株が産生するAPP をコードするDNA は、以上に述べたDNA を市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNA フラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン（ATG）及び／又は終始コドン（ATT、TGA 又はTAG）の挿入等が挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPP の発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウィルス由来の発現ベクター、例えばpHSV、pMV、酵母由来の発現ベクター、例えばpNV11、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2が挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPP の発現ベクターには、例えばAPP

をコードするDNA を、発現ベクターの中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。プロモーター／エンハンサーとしては、哺乳動物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばEF1- α プロモーター／エンハンサー、 γ -アクチンプロモーター／エンハンサー、昆虫ウィルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えば多核体（ポリヘドリン）ウィルスプロモーター／エンハンサー、植物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばタバコモザイクウィルスプロモーター／エンハンサー、動物ウィルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えばSV40プロモーター／エンハンサー、ヒトCMV プロモーター／エンハンサー、酵母由来のプロモーター／エンハンサー、例えばアルコール脱水素酵素プロモーター／エンハンサー、大腸菌由来のプロモーター／エンハンサー、例えばLac プロモーター／エンハンサー、Trp プロモーター／エンハンサー、Tac プロモーター／エンハンサーが挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPP の発現には、発現に用いられる宿主に適したシグナル配列を付加して使用してもよい。シグナル配列としては、例えば分泌蛋白質のシグナル配列が挙げられる。分泌蛋白質のシグナル配列としては、例えば哺乳動物由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばイムノグロブリンのシグナル配列が挙げられる。また分泌蛋白質のシグナル配列としては、大腸菌由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばOmpA等のペリプラズム分泌シグナル配列が挙げられる。

このように作製した発現ベクターは、公知の方法により宿主に導入することができる。宿主への導入の方法としては、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、リポソーム法が挙げられる。

発現ベクターの複製開始点としては、SV 40 、ポリオーマウィル

ス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。また、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を含むことができる。また、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Graham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-r74)。

本発明の細胞株は、任意の細胞株を使用することができる。このような細胞株としては、真核細胞が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞がある。動物細胞としては、(1) 哺乳動物細胞、例えば CHO (J. EAPPP. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、巨核芽球系細胞、(2) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

植物細胞としては、ニコシアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (Aspergillus) 属、例えばア

スペルギウス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

これらの細胞をAPP をコードする遺伝子を含む発現ベクターにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりAPP を産生する細胞が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は約 6-8 であるのが好ましい。培養は通常約 30-40 °C で約 15-200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

APP の代謝経路は、(1) α -セクレターゼによる切断でAPP の可溶性N 末フラグメント (sAPP α) を生じる経路と (2) β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼによりAPP の可溶性N 末フラグメント (sAPP β) と A β を生じる経路がある。

α -セクレターゼは、APP695の612 位のアミノ酸Lys と613 位のアミノ酸Lys の間を切断し、sAPP α を生じさせる活性を持つ。通常の細胞は α -セクレターゼ活性を有する。

β -セクレターゼは、A β のN 末端側を切り出す活性を有する。 β -セクレターゼは、APP695の596 位のアミノ酸Met と597 位のアミノ酸Asp の間を切断し、sAPP β を生じさせる活性を持つ。 β -セクレターゼによるAPP の切断部位は決まっている。 β -セクレターゼは γ -セクレターゼと共にAPP に作用することにより A β を生じさせる。通常の細胞には β -セクレターゼ活性がある。なお、APP が α -セクレターゼで切断されると β -セクレターゼはAPP に作用しない。

γ -セクレターゼは、A β のC 末端側を切り出す活性を有する。 γ -セクレターゼ活性は、切断部位が前後することが知られており、したがって切り出される A β のC 末端のアミノ酸は不均一である

。従って、 γ -セクレターゼとして複数の酵素が存在する可能性がある。 γ -セクレターゼの一例として、APP695の638 位のアミノ酸 Thr と639 位のアミノ酸 Val の間を切断し、sAPP β と A β とを含むポリペプチドを生じさせる活性を持つものが知られている。 γ -セクレターゼは、 β -セクレターゼと共に作用することによりAPP から A β を生じさせる。通常の細胞には γ -セクレターゼ活性がある。

α -セクレターゼ、 β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼのAPP に対するプロテアーゼ活性を図1.に模式的に示す。

A β は、APP から切り出されるアミノ酸39-42 個のペプチドである。 β -セクレターゼにより切り出されるN 末端は決まっているが、 γ -セクレターゼにより切り出されるC 末端は不均一である。したがって、アミノ酸残基の数が異なる A β が知られているが、本発明ではいずれのアミノ酸残基数を持つものであってもよい。アミノ酸残基数42の A β のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。

本発明は、(1)上述の細胞株にDNA ライブラリーを導入し、(2) 導入したDNA を発現させ、(3) β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択し、(4)選択された細胞から β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA を単離する、ことからなる β -セクレターゼをコードするDNA のクローニング方法に関する。

導入されるDNA ライブラリーは、種々の細胞、組織又は臓器から得られたcDNAライブラリーまたはジェノミックDNA ライブラリーであってよい。これらのDNA ライブラリーは、市販のDNA ライブラリーであってよい。これらライブラリーに用いられるベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、YAC ベクター等いかなるものであってもよい。

cDNAライブラリーを作成するには、具体的には所望の細胞、組織

、又は臓器からmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業製)等を用いて行うこともできる。また、cDNAの合成および増幅を行うにはMarathon cDNA Amplification kit(CLO NTECH製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; RCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。

得られたPCR産物からcDNA断片を調製し、所望の発現ベクターDNAと連結すればよい。

cDNAライブラリーは、哺乳動物由来のcDNAライブラリーが好ましい。哺乳動物由来の細胞、器官、組織、臓器からcDNAライブラリーを取得する。哺乳動物としては、好ましくはヒトである。cDNAライブラリーの単離源としては、好ましくはヒト脳である。

β -セクレターゼ活性とは、上述のとおり、APPからsAPP β を切り出す活性である。したがって、 β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択するには、細胞の培養上清中のsAPP β を検出又は測定すればよい。sAPP β は、精製した状態であるいは粗精製の状態で検出又は測定することができる。

初めに精製された又は粗精製されたsAPP β を支持体に結合させる。sAPP β を支持体に結合させる際に標準的な方法でsAPP β を支持体に結合させることができる。sAPP β を結合させる支持体としては、例えば不溶性の多糖類、例えばアガロース、デキストラン、セルロース、合成樹脂、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等が挙げられる。より具体的にはそれらを原料として製造される市販のビーズ、プレートが用いられる。ビーズの場合、これらが充填されたカラム等を用いてもよい。プレートの場合、マルチウェルプレート（96穴マルチウェルプレート等）やバイオセンサーチップが挙げられる。

sAPP β と支持体との結合は、化学結合、物理的な吸着等、通常用いられる方法により結合すればよい。また、sAPP β を特異的に認識する抗体を予め支持体に結合せしめ、この抗体とsAPP β とを結合させることにより結合することもできる。さらに、アビジン／ビオチンを介して結合させることができる。

sAPP β の検出又は測定は、通常緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、Tris緩衝液等が使用される。また、インキュベートの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば4℃～室温にて1時間～24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、sAPP β と支持体との結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば界面活性剤を含む緩衝液が使用される。界面活性剤としては、例えば0.05%Tween 20が使用される。

sAPP β を検出又は測定するには、適切な条件下でインキュベート及び洗浄することにより、特異的な結合と非特異的な結合を分離することができる。そして、sAPP β を検出又測定すればよい。本方法において、試料中のsAPP β を検出又は測定する群と共にコントロー

ル群を設置してもよい。コントロール群としては、sAPP β を含まない陰性コントロール群又はsAPP β を含む陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。

本発明においてsAPP β を検出又は測定する際、単にsAPP β を検出するだけでもよいし、又はsAPP β を定量的に測定してもよい。これらの場合、sAPP β を含まない陰性コントロール群で得られた結果、試料で得られた結果及び／又はsAPP β を含む陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、目的のsAPP β を検出することができる。

これらの結果を数値として得、それらの数値を比較することにより、sAPP β を定量的に測定することができる。また、定量的に測定する場合、sAPP β を既知量含む陽性コントロール群で得られた数値により作成された標準曲線を元に定量することができる。

本方法において、sAPP β を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することができる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは蛋白質-蛋白質間の相互作用を微量の蛋白質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore ; Pharmacia 製）。したがって、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることによりsAPP β を検出又は測定することが可能である。

すなわち、sAPP β を含む試料を固定化したセンサーチップに、sAPP β を検出するための抗体を接触させ、固定化したsAPP β に結合する抗体を共鳴シグナルの変化として検出しようとするものである。具体的には以下のように行えばよい。初めにセンサーチップCM5（Biosensor 製）を活性化して培養上清中のsAPP β をセンサーチップ上に固定化する。すなわち、EDC / NHS 水溶液（200mM EDC（N-エ

チル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カーボネート塩酸塩), 50 mM NHS (N-hydroAPPysuccinimide)) によりセンサーチップを活性化した後、HBS バッファー (10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.05% Tween20) によりセンサーチップを洗浄する。

次にHBS バッファーに溶解した適量のsAPP β を特異的に認識する抗体をセンサーチップに接触させ、固定化する。HBS バッファーによりセンサーチップを洗浄後、エタノールアミン溶液 (1Mエタノールアミン塩酸塩, pH8.5)によりセンサーチップ上の残存活性基をブロックする。再びHBS バッファーによりセンサーチップを洗浄する。

次にHBS バッファーに溶解した適量のsAPP β を特異的に認識する抗体を注入する。このときにセンサーチップに固定化されたsAPP β に結合するsAPP β を特異的に認識する抗体の量は共鳴シグナル値の増加として観察される。このとき、コントロール群を設置してもよい。コントロール群としてはsAPP β を含まない陰性コントロール群又はsAPP β を含む陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。

センサーチップに結合したsAPP β に結合した抗sAPP β 抗体は共鳴シグナル値の変化量として定量的に測定することができる。この場合、sAPP β を含まない陰性コントロール群で得られた結果及び/又はsAPP β を含む陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、sAPP β を検出、決定することができる。

sAPP β の検出又は測定において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として、sAPP β を標識しその標識を検出又は測定することができる。

例えば、sAPP β の検出又は測定において、sAPP β を特異的に認識する抗体をあらかじめ標識しておき、sAPP β とインキュベートした

後、洗浄して結合しているsAPP β を特異的に認識する抗体をその標識により検出又は測定する。

sAPP β を特異的に認識する抗体は、通常知られる方法により標識されることができる。標識物質としては、例えば放射性同位元素、酵素、蛍光物質、ビオチン／アビジン等が挙げられる。これらの標識物質は市販の標識物質を使用することができる。放射性同位元素としては、例えば ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S が挙げられる。酵素としては、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ等が挙げられる。蛍光物質としては、例えばフロオロセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンが挙げられる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、sAPP β を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、sAPP β を特異的に認識する抗体をプレートに加える。同時にsAPP β を含まない群（陰性コントロール）及び／又は既知濃度のsAPP β を加えた群（陽性コントロール）を置き、これらをインキュベートする。

インキュベートの後、洗浄し結合した抗体を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すればsAPP β を検出又は測定することができる。sAPP β を検出又は測定する手段として、sAPP β を特異

的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体を用いることができる。

例えば、sAPP β を含む試料とともにsAPP β を特異的に認識する抗体を接触させ、インキュベートした後、洗浄して結合しているsAPP β を特異的に認識する抗体をそれを特異的に認識する二次抗体により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させたsAPP β にsAPP β を特異的に認識する抗体を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合しているsAPP β を特異的に認識する抗体をそれを特異的に認識する二次抗体により検出又は測定すればよい。二次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、sAPP β を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、sAPP β を特異的に認識する抗体をプレートに加える。同時にsAPP β を含まない群（陰性コントロール）及び／又は既知濃度のsAPP β を加えた群（陽性コントロール）を置き、これらをインキュベートする。

インキュベートの後、洗浄しsAPP β を特異的に認識する抗体に対する二次抗体を加える適度なインキュベーションの後、洗浄して、そのsAPP β を特異的に認識する一次抗体を特異的に認識する二次抗体によりsAPP β を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値を比較すればsAPP β を検出又は／測定することができる。

より詳しくは、本発明は特に好ましくはELISA（Enzyme-linked

Immunosorbent Assay) により次のようにして行うことができる。細胞の培養上清中の sAPP β を検出又は測定するには、例えばサンドイッチ型の ELISA による検出又は測定を行えばよい。96 穴イムノプレートに sAPP β を特異的に認識し sAPP α を認識しない抗体を加え、4 °C にて一晩インキュベートして抗体をプレートにコートする。次にプレートを PBS (Phosphate Buffered Saline) 等で洗浄し、25 % ブロックエースと 7 ~ 10 時間インキュベートし、蛋白質の非特異的な結合を防ぐためにブロッキングを行う。

次いで、細胞の培養上清サンプルと APP の N 末端を特異的に認識する一次抗体を加え 4 °C にて一晩インキュベートする。インキュベート後、プレートを PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と室温で 1 時間インキュベートする。その後、ペルオキシダーゼの基質を用いて室温 10 分間発色させ、マイクロプレートリーダー (バイオ ラット製) で吸光度を測定する。

sAPP β の検出又は測定は、High Throughput Screening (HTS)) にも使用することができる。具体的には、ブロッキングまでを手作業で行い、その後の反応はロボットによって行うことでオートメーション化し、High Throughput Screening を実現することができる。すなわち、sAPP β を含む溶液を固相化バッファー (0.1 M NaHCO₃、0.02% NaN₃、pH9.6) により希釈する。96 穴のイムノプレート (Nunc 製) の各穴に希釈したこの水溶液を適量加え 4 °C で一晩インキュベートする。

洗浄バッファー (PBS に 0.05% Tween20 となるよう調製したもの) で 3 回各穴を洗浄後、PBS に溶解した 5% BSA (SIGMA 製) 溶液 200 μ l を加え、4 °C で一晩ブロッキングする。次に、例えば Biomek 2000 HTS system (Beckman 製) にブロッキング済みのイムノプレートをセットしてシステムのコントロールプログラムを実行する。こ

の際、分注機としてはBiomek 2000 分注機(Beckman製)あるいはMultipipette96穴同時分注器(Sagian 製)を用いることでイムノプレート各穴への溶液の分注や溶液の除去を行うことができる。

また、イムノプレートの各穴の洗浄にはEL404 マイクロプレートウォッシャー(Bio Tek製)を用いることができる。また、吸光度の測定にはSPECTRAMaAPP250 プレートリーダー(Molecular Devices製)を用いることができる。

プログラムは以下の操作をおこなうよう設定する。すなわち洗浄バッファーで3 回各穴を洗浄し、sAPP β を特異的に認識する抗体を希釈バッファー(1% BSA、0.5% Tween20、PBS)で希釈する。同時にsAPP β を含まない群(陰性コントロール)及び既知濃度のsAPP β を加えた群(陽性コントロール)を置き、これらを室温で1 時間インキュベートする。

洗浄バッファーで各穴を3 回洗浄し、希釈バッファーで5000倍に希釈したウサギ抗sAPP β 抗血清を100 μ l 各穴に加え、室温で1 時間インキュベートする。洗浄バッファーで各穴を3 回洗浄し、希釈バッファーで 5000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG 抗体(TAGO製)を 100 μ l 各穴に加え、室温で1 時間インキュベートする。

洗浄バッファーで5 回各穴を洗浄し、発色溶液(基質バッファー; 50 mM NaHCO₃、10mM MgCl₂、pH9.8 に 1 mg/mlの濃度に溶解したp-ニトロフェニルフォスフェート(Sigma 製))を 100 μ l 各穴に加え、室温で反応させた後に 405 nm での吸光度をマイクロプレートリーダー、Biomekプレートリーダー(Beckman / Molecular Devices製)を用いて測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すればsAPP β を検出又は測定することができる。

sAPP β を検出又は測定するために使用される抗体は、市販の抗体

や市販のキットに含まれる抗体を用いることもできるし、公知の手段を用いてモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体として得ることができる。

ポリクローナル抗体を得るには、感作抗原を動物に免疫し、動物の血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。このようにして所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる。また、所望の結合活性を有するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、 Fab 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 又はH鎖とL鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv ($scFv$) が挙げられる。

前記のように得られた抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製

は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

上記で得られた抗体の濃度測定又は活性確認は、公知の方法、例えばELISA、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。

上記のように得られた一次抗体又は二次抗体は、通常知られる方法により標識されることができる。標識物質としては、例えば放射性同位元素、酵素、蛍光物質等が挙げられる。これらの標識物質は市販の標識物質を使用することができる。放射性同位元素としては、例えば ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S が挙げられる。酵素としては、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ等が挙げられる。蛍光物質としては、例えばフロオロセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンが挙げられる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

本発明は、（1）無刺激下で本発明の細胞株からDNAを調製し、（2）刺激下で本発明の細胞株からDNAを調製し、（3）（1）で得られたDNAに存在せず且つ（2）で得られたDNAに存在するDNAクローンを得、（4） β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことからなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法に関する。細胞から調製するDNAは、好ましくはcDNAである。cDNAの調製方法は本明細書に記載した方法にしたがえばよい。

本発明の細胞株の刺激は、細胞分化誘導物質を使用することができる。細胞分化誘導物質として、好ましくはホルボールエステル、IL-3、レチノイン酸等を使用することができる。

無刺激下で調製されたDNA に存在せず且つ刺激下で調製されたDNA に存在するDNA クローンを得るには、刺激下で調製されたDNA と無刺激下で調製されたDNA とにともに存在するDNA を除去すればよい。刺激下で調製されたDNA と無刺激下で調製されたDNA とにともに存在するDNA を除去するには、ディファレンシャルクロニング法 (Lau, L.F. et al., and Nathans, D. EMBO J. (1985) 4, 3145-3151), ディファレンシャルディスプレイ法 (Liang, P. and Pardee, A.B. Science (1992) 257, 967-971)、サブトラクティブクロニング法 (Hedrick, S.M. et al., Nature (1984) 308, 149-153) 又はシリアルアナリシスジーンエクスペッション法 (SAGE法) (Velculescu, V.E. et al., Science (1995) 270, 484-487) 等を使用することができる。

ディファレンシャルクロニング法は、刺激下で得られたcDNAライブラリーを標識し、標識したcDNAライブラリーをファージに導入し、これを細胞、例えばE.coli等に感染させ、プレートにまく。生じたプラークを2枚の膜、例えばニトロセルロース膜等に写し取り、各々の膜を無刺激下で得られたcDNAと刺激下で得られたcDNAとでハイブリダイズさせる。刺激下で特異的にハイブリダイズし、無刺激下でハイブリダイズしないプラークからcDNAを単離すればよい。

ディファレンシャルディスプレイ法は、無刺激下で得られたcDNAライブラリーと刺激下で得られたcDNAライブラリーそれぞれをテンプレートとし、数種類のオリゴdTアンカープライマーと数種類のランダムプライマーの組み合わせによるPCR 反応を行ったのち、それぞれから生成するPCR 産物をゲル電気泳動によって分離する。無刺激及び刺激間において、分離されたPCR 産物、即ちバンドの出現パターンを詳細に比較し、無刺激では存在せず刺激下で存在するバンド或いは無刺激に較べ刺激下で増加する (バンドのシグナル強度

が増加する) バンドを同定、単離し、この DNA断片から全長 cDNAを単離すればよい。

サブトラクティブクローニング法は、無刺激下で得られた cDNAをビオチン等で標識し、刺激下で得られた cDNAとをハイブリダイズさせる。次いで、ハイブリダイズした cDNAを対応する標識、例えばアビジン等により除去する。これを繰り返して、刺激下で特異的に存在し、無刺激下で存在しない cDNAを単離すればよい。このようにして得られた cDNAクローンを適切な細胞に導入し、上述の sAPP β を検出又は測定する方法にしたがって β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA を単離すればよい。

シリアルアナリシスジーンエクспレッション法は、上記参考論文に記載されているような方法を用いることができる。シリアルアナリシスジーンエクспレッション法により、無刺激下及び刺激下の細胞において発現している遺伝子、即ち mRNAの存在比率をおのこの遺伝子断片の塩基配列の出現頻度として知ることができる。この遺伝子の出現頻度を無刺激と刺激間で比較し、無刺激では存在せず刺激下でのみで存在する配列或いは無刺激に較べ刺激下で出現頻度が増加する配列を同定し、それらをもとに cDNAを単離すればよい。

実施例

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1. APP発現ベクターの構築

APP695、あるいは家族性アルツハイマー病で発見された二重変異を導入した APP695 (APP695 N L) の cDNA を、哺乳動物細胞発現ベクターである pCEP4 (インビトロゲン製、カルフォルニア)

のマルチクローニングサイトに組み込むことによりAPP 発現ベクターを作成した。

APP695NLのcDNAは、Trans former Site-Directed Mutagenesisキット（クロンテック製）を用いて、APP695のcDNAの595位のアミノ酸リジンをアスパラギンに、また596位のアミノ酸メチオニンをロイシンに変えることにより作成した。

実施例2. APP発現クローンの作成

ヒトの巨核芽球系細胞は10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640中で、またヒトのニューロblastomaであるSH-SY5Y細胞は10%ウシ胎児血清を含むDMEM/F-12中で維持した。巨核芽球系細胞はLipofectamine（ギブコ製）を用い、またSH-SY5Y細胞はリン酸カルシウムトランスフェクションシステム（ギブコ製）を用い、APP 発現ベクターを細胞に導入した。遺伝子を導入した細胞はハイグロマイシンB（和光純薬工業製）により選択を行い、各発現クローン細胞を得た。巨核芽球系細胞APP 発現クローンは、MK/AP8、MK/AP9細胞と名付けられた。また、変異を含むAPPを発現する巨核芽球系細胞クローンは、各々MK/NL2、MK/NL10細胞と名付けられた。

実施例3. ウェスタン分析

APPにはヘパリン結合部位があることが知られているので、まず培養上清中の分泌型APPをヘパリン-Sepharose（ファルマシア製）を用いたバッチ法により濃縮し、そのサンプルを用いてウェスタン分析を行った。すなわち、各培養上清液は1500回転5分間遠心後、ヘパリン-Sepharoseと4℃、2時間インキュベートした。

ヘパリン-SepharoseはPBSにより洗浄した後、1.5M NaCl/PBS溶液を用いて結合した蛋白を溶出させた。溶出蛋白に2倍濃度のサンプルバッファー（70mMトリスpH6.7、20%

グリセロール、5 % 2-メルカプトエタノール、2 % SDS) を等量加え、100 °C 5 分間処理した後、SDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行った。

泳動後PVDF-Plus メンブレン (フナコシ製) にブロットし、一次抗体と反応させた後、ビオチン化した各二次抗体 (フナコシ製) とインキュベートし、Vectastainエリートキット (フナコシ製) を用い4-クロルナフトール (和光純薬工業製) を基質として発色させた。

一次抗体としては、抗APPN末端抗体、sAPP α のC末端16アミノ酸を抗原としたウサギ抗血清である2570抗体、及びsAPP β のC末端7アミノ酸を抗原として取得したウサギ抗血清である2560、2561抗体を用いた。

なお、抗sAPP β 抗体 (2560抗体、2561抗体) は、sAPP β のC末端7アミノ酸 (GluIleSerGluValLysMet、配列番号: 3) のN末端部位にキャリアー蛋白としてKLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) を融合させ、アジュバントと混ぜた後にウサギに免疫することにより作成した。

また抗sAPP α 抗体 (2570抗体) は、抗sAPP β 抗体の場合と同様にsAPP α のC末端16アミノ酸 (Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys、配列番号: 4) にKLHを結合させ、ウサギに免疫することにより作成した。2570抗体と2560及び2561抗体は、分子量のわずかに違うsAPP α とsAPP β と考えられるバンドをそれぞれ特異的に認識し、免疫染色しわけることが確認されている。

実施例4. 分泌型APPのウェスタンブロット分析

巨核芽球系細胞およびAPP発現クローンMK/AP8, MK/AP9細胞を、10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640中で3~4日培

養した培養上清についてウェスタン分析した結果を図2に示す。各レーンには約600 μ l 相当の培養上清を用いている。

一次抗体としてレーン1～3には2561抗体 (a n t i - sAPP β) を、レーン4～6には抗APPN末抗体を、レーン7～9には2570抗体 (a n t i - sAPP α) を用いた。

レーン1、4、7は巨核芽球系細胞の、レーン2、5、8はMK/A P 8細胞の、レーン3、6、9はMK/A P 9細胞の結果を示す。図2より明らかなように巨核芽球系細胞ではsAPPは検出されず、APP発現クローン細胞でのみ分子量約100～120KD α のsAPP α のシングルバンドが検出された。一方sAPP β についてはどの細胞にも検出されなかった。

実施例5. ホルボールエステルの作用

MK/A P 8細胞を6穴培養プレートに 3×10^5 個培養し、ホルボールエステル (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate、シグマ製) を100 nM添加した。培養液は3日おきに交換し、ホルボールエステルは6日間作用させた。培養6、12、17、21、24日目の培養上清についてウェスタン分析した結果を図3Aに示す。各レーンには約250 μ l 相当の培養上清を用いている。一次抗体としてレーン1～5には2561抗体を、レーン6～10には2570抗体を用いた。それぞれ左のレーンより培養6、12、17、21及び24日目の結果を示す。

ホルボールエステルを作用させることにより培養12日目よりsAPP α と同時にsAPP β が検出された。同様の実験をAPP/N L発現クローンMK/N L 2細胞、およびMK/N L 10細胞について行った結果を図3Bに示す。この実験ではホルボールエステルを12日間作用させた。各レーンには約125 μ l 相当の培養上清を用いている。レーン1～2には2561抗体を、レーン3～4には2570抗体を用いた。

それぞれ左のレーンがMK/N L 2細胞の結果を示す。MK/N

L細胞の場合も同様にホルボールエステルを作用させることにより sAPP β が検出され、その量はMK/AP8細胞よりも多かった。

実施例6. エンザイムイムノアッセイ

各細胞の培養上清中の分泌型APPについては、サンドイッチ型のエンザイムイムノアッセイによる半定量的な測定を行った。すなわち、まず96穴イムノプレート（ナルゲ ヌンク製）を、2560抗体あるいは2570抗体（5000ナノグラム／ウェル）と4℃にて一晩インキュベートすることにより抗体のコーティングを行った。次にプレートは、PBSで洗浄した後25%ブロックエースと7～10時間インキュベートすることによりブロッキングを行った。

そして各培養上清サンプル（40 μ ）および抗APP N末抗体（最終500倍希釈）を加え4℃にて一晩インキュベートした。さらにプレートはPBSで洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体（バイオソース製）と室温にて1時間インキュベートした後、TMBマイクロウエル ペルオキシダーゼ キシツシステム（フナコシ製）にて室温10分間発色させ、マイクロプレートリーダー（バイオ ラット製）を用いて450nmの吸光度の測定を行った。なお2560抗体と2570抗体は、それぞれsAPP β あるいはsAPP α のC末端5アミノ酸を結合させたアフィニティーカラム（HyTrap, ファルマシア製）を用いて精製したものを使用した。

実施例7. エンザイムイムノアッセイによる分泌型APPの定量

APP発現クローンSH-SY5Y/AP4細胞を、10%ウシ胎児血清を含むDMEM/F-12中で3日間培養した培養上清について、分泌型APPのエンザイムイムノアッセイを行った結果を図4に示す。培養上清は、10%ウシ胎児血清を含むDMEM/F-12で希釈した後に測定を行った。sAPP α 、sAPP β ともに約3000倍希釈より吸光度の上昇がみられ、100倍希釈以上の濃度ではほぼプラトーに達

し、このアッセイシステムによりそれぞれの分泌型APPが高感度に測定できることが判明した。

次に、図3 で用いたホルボールエステルを作用させたMK/AP8細胞の培養上清について、エンザイムイムノアッセイを行った結果を図5に示す。2570抗体については培養液で100倍希釈したサンプルを、また2560抗体については原液と培養液で10倍希釈したサンプルを用いて測定した。日数0のデータはホルボールエステルを作用させていないMK/AP8細胞の培養上清の結果である。エンザイムイムノアッセイでもMK細胞ではsAPP β は検出されずsAPP α のみが検出された。さらにホルボールエステルを作用させることによりsAPP β が検出されるようになった。

本来APPを生成しないことが知られていた巨核芽球系細胞にAPPを強制発現させ、その代謝を調べた。巨核芽球系細胞ではAPPは α -セクレターゼでのみ切断を受け、 β -セクレターゼでは切断されないことが、ウェスタン分析およびエンザイムイムノアッセイの両方の解析法により判明した。

通常の細胞にAPPを強制発現させた場合は、APPは α -セクレターゼと β -セクレターゼの両方で代謝を受けることが報告されており、その意味において本発明の細胞株は非常にユニークであると考えられる。

なお、得られた巨核芽球系細胞株MK/AP8は、平成10年（1998年）3月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-6287として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

参考例

本実験に用いたエンザイムイムノアッセイが高感度であったため、このアッセイシステムと、APPを強制発現させた本発明の細胞株

を利用することにより、 β -セクレターゼのクローニングが可能である。すなわち、 β -セクレターゼが発現していると考えられるヒト脳、あるいはS H-S Y5 Y細胞のmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成する。

pCEP4ベクターを細胞内での発現ベクターとして用い、このベクターに作成したcDNAライブラリーを組み込む。作成したベクターはコンピテント細胞に導入し、1プール当たり約50クローンを含むE. coliのプールを96穴のプレートを用いて作成する。APPを発現している本発明の細胞株を96穴のプレートに培養し、各2～4プールのE. coliより調整したDNAを導入する。

2～3日後の各細胞培養の上清についてsAPP β のエンザイムイムノアッセイを行い、ポジティブなプールを検出する。得られたポジティブなcDNAのプールよりcDNAのクローンを作成し、同様の操作を繰り返すことにより β -セクレターゼをクローニングを進めることができる。

またホルボールエステルにより巨核芽球系細胞が分化誘導を受けることが知られていることより、ホルボールエステルにより巨核芽球系細胞でのAPPの代謝が変化するかどうかを検討した。その結果ホルボールエステル処理することにより、APPを強制発現させた巨核芽球系細胞でもsAPP β が生成するようになることが判明した。この事実に基づき、本発明の細胞株は β -セクレターゼのクローニングに利用できる。すなわち、ホルボールエステルにより β -セクレターゼが誘導されたと考え、ディファレンシャル ディスプレイ法等によりクローニングを進めることが可能になると考えられる。

産業上の利用可能性

細胞株にAPP遺伝子を導入することにより、 β -セクレターゼ活

性を発現しない細胞株が樹立された。本細胞株は、 β -セクレターゼの遺伝子を単離するために有用である。また、本細胞株を用いて β -セクレターゼの遺伝子をクローニングする方法が提供される。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名 称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1) 表 示：MK/AP8

寄託番号：FERM BP-6287

寄託日：1998年3月9日

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 3 3 5 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

AGTTTCCTCG GCAGCGGTAG GCGAGAGCAC GCGGAGGAGC GTGCGCGGGG GCCCCGGGAG 60
 ACGGCGGCGG TGGCGGCGCG GGCAGAGCAA GGACGCGGCG GATCCCACTC GCACAGCAGC 120
 GCACTCGGTG CCCC GCGCAG GGTGCGG ATG CTG CCC GGT TTG GCA CTG CTC CTG 174
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu

5

CTG GCC GCC TGG ACG GCT CGG GCG CTG GAG GTA CCC ACT GAT GGT AAT 222
 Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn
 10 15 20 25
 GCT GGC CTG CTG GCT GAA CCC CAG ATT GCC ATG TTC TGT GGC AGA CTG 270
 Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu
 30 35 40
 AAC ATG CAC ATG AAT GTC CAG AAT GGG AAG TGG GAT TCA GAT CCA TCA 318
 Asn Met His Met Asn Val Gln Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser
 45 50 55
 GGG ACC AAA ACC TGC ATT GAT ACC AAG GAA GGC ATC CTG CAG TAT TGC 366
 Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys
 60 65 70

CAA GAA GTC TAC CCT GAA CTG CAG ATC ACC AAT GTG GTA GAA GCC AAC	414
Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn	
75 80 85	
CAA CCA GTG ACC ATC CAG AAC TGG TGC AAG CGG GGC CGC AAG CAG TGC	462
Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys	
90 95 100 105	
AAG ACC CAT CCC CAC TTT GTG ATT CCC TAC CGC TGC TTA GTT GGT GAG	510
Lys Thr His Pro His Phe Val Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu	
110 115 120	
TTT GTA AGT GAT GCC CTT CTC GTT CCT GAC AAG TGC AAA TTC TTA CAC	558
Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His	
125 130 135	
CAG GAG AGG ATG GAT GTT TGC GAA ACT CAT CTT CAC TGG CAC ACC GTC	606
Gln Glu Arg Met Asp Val Cys Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val	
140 145 150	
GCC AAA GAG ACA TGC AGT GAG AAG AGT ACC AAC TTG CAT GAC TAC GGC	654
Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly	
155 160 165	
ATG TTG CTG CCC TGC GGA ATT GAC AAG TTC CGA GGG GTA GAG TTT GTG	702
Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val	
170 175 180 185	
TGT TGC CCA CTG GCT GAA GAA AGT GAC AAT GTG GAT TCT GCT GAT GCG	750
Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala	
190 195 200	
GAG GAG GAT GAC TCG GAT GTC TGG TGG GGC GGA GCA GAC ACA GAC TAT	798
Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr	
205 210 215	

GCA GAT GGG AGT GAA GAC AAA GTA GTA GAA GTA GCA GAG GAG GAA GAA	846
Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu	
220 225 230	
GTG GCT GAG GTG GAA GAA GAA GAA GCC GAT GAT GAC GAG GAC GAT GAG	894
Val Ala Glu Val Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu	
235 240 245	
GAT GGT GAT GAG GTA GAG GAA GAG GCT GAG GAA CCC TAC GAA GAA GCC	942
Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala	
250 255 260 265	
ACA GAG AGA ACC ACC AGC ATT GCC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACA GAG	990
Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu	
270 275 280	
TCT GTG GAA GAG GTG GTT CGA GTT CCT ACA ACA GCA GCC AGT ACC CCT	1038
Ser Val Glu Glu Val Val Arg Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro	
285 290 295	
GAT GCC GTT GAC AAG TAT CTC GAG ACA CCT GGG GAT GAG AAT GAA CAT	1086
Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His	
300 305 310	
GCC CAT TTC CAG AAA GCC AAA GAG AGG CTT GAG GCC AAG CAC CGA GAG	1134
Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu	
315 320 325	
AGA ATG TCC CAG GTC ATG AGA GAA TGG GAA GAG GCA GAA CGT CAA GCA	1182
Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala	
330 335 340 345	
AAG AAC TTG CCT AAA GCT GAT AAG AAG GCA GTT ATC CAG CAT TTC CAG	1230
Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln	
350 355 360	

GAG AAA GTG GAA TCT TTG GAA CAG GAA GCA GCC AAC GAG AGA CAG CAG 1278
 Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln
 365 370 375
 CTG GTG GAG ACA CAC ATG GCC AGA GTG GAA GCC ATG CTC AAT GAC CGC 1326
 Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg
 380 385 390
 CGC CGC CTG GCC CTG GAG AAC TAC ATC ACC GCT CTG CAG GCT GTT CCT 1374
 Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro
 395 400 405
 CCT CGG CCT CGT CAC GTG TTC AAT ATG CTA AAG AAG TAT GTC CGC GCA 1422
 Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala
 410 415 420 425
 GAA CAG AAG GAC AGA CAG CAC ACC CTA AAG CAT TTC GAG CAT GTG CGC 1470
 Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg
 430 435 440
 ATG GTG GAT CCC AAG AAA GCC GCT CAG ATC CGG TCC CAG GTT ATG ACA 1518
 Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr
 445 450 455
 CAC CTC CGT GTG ATT TAT GAG CGC ATG AAT CAG TCT CTC TCC CTG CTC 1566
 His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu
 460 465 470
 TAC AAC GTG CCT GCA GTG GCC GAG GAG ATT CAG GAT GAA GTT GAT GAG 1614
 Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu
 475 480 485
 CTG CTT CAG AAA GAG CAA AAC TAT TCA GAT GAC GTC TTG GCC AAC ATG 1662
 Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met
 490 495 500 505

ATT AGT GAA CCA AGG ATC AGT TAC GGA AAC GAT GCT CTC ATG CCA TCT 1710
 Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser
 510 515 520
 TTG ACC GAA ACG AAA ACC ACC GTG GAG CTC CTT CCC GTG AAT GGA GAG 1758
 Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu
 525 530 535
 TTC AGC CTG GAC GAT CTC CAG CCG TGG CAT TCT TTT GGG GCT GAC TCT 1806
 Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser
 540 545 550
 GTG CCA GCC AAC ACA GAA AAC GAA GTT GAG CCT GTT GAT GCC CGC CCT 1854
 Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro
 555 560 565
 GCT GCC GAC CGA GGA CTG ACC ACT CGA CCA GGT TCT GGG TTG ACA AAT 1902
 Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn
 570 575 580 585
 ATC AAG ACG GAG GAG ATC TCT GAA GTG AAG ATG GAT GCA GAA TTC CGA 1950
 Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg
 590 595 600
 CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT CAT CAT CAA AAA TTG GTG TTC TTT GCA 1998
 His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 605 610 615
 GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC 2046
 Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
 620 625 630
 GGT GTT GTC ATA GCG ACA GTG ATC GTC ATC ACC TTG GTG ATG CTG AAG 2094
 Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys
 635 640 645

AAG AAA CAG TAC ACA TCC ATT CAT CAT GGT GTG GTG GAG GTT GAC GCC 2142

Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala

650

655

660

665

GCT GTC ACC CCA GAG GAG CGC CAC CTG TCC AAG ATG CAG CAG AAC GGC 2190

Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly

670

675

680

TAC GAA AAT CCA ACC TAC AAG TTC TTT GAG CAG ATG CAG AAC 2232

Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn

685

690

695

TAGACCCCG CCACAGCAGC CTCTGAAGTT GGACAGCAA ACCATTGCTT CACTACCCAT 2292

CGGTGTCCAT TTATAGAATA ATGTGGGAAG AAACAAACCC GTTTTATGAT TTA CTCTATTA 2352

TCGCCTTTTC ACAGCTGTGC TGTAACACAA GTAGATGCCT GAACTTGAAT TAATCCACAC 2412

ATCAGTAATG TATTCTATCT CTCTTTACAT TTTGGTCTCT ATACTACATT ATTAATGGGT 2472

TTTGTGTACT GTAAAGAATT TAGCTGTATC AAAGTAGTGC ATGAATAGAT TCTCTCCTGA 2532

TTATTTATCA CATAGCCCCT TAGCCAGTTG TATATTATTC TTGTGGTTTG TGACCCAATT 2592

AAGTCCTACT TTACATATGC TTAAAGAATC GATGGGGGAT GCTTCATGTG AACGTGGGAG 2652

TTCAGCTGCT TCTCTTGCCT AAGTATTCCT TTCCTGATCA CTATGCATTT TAAAGTAAA 2712

CATTTTAAAG TATTTTACAGAT GCTTTAGAGA GATTTTTTTT CCATGACTGC ATTTTACTGT 2772

ACAGATTGCT GCTTCTGCTA TATTTGTGAT ATAGGAATTA AGAGGATACA CACGTTTGTT 2832

TCTTCGTGCC TGTTTTATGT GCACACATTA GGCATTGAGA CTTCAAGCTT TTCTTTTTTT 2892

GTCCACGTAT CTTTGGGTCT TTGATAAAGA AAAGAATCCC TGTTCATTGT AAGCACTTTT 2952

ACGGGGCGGG TGGGGAGGGG TGCTCTGCTG GTCTTCAATT ACCAAGAATT CTCCAAAACA 3012

ATTTTCTGCA GGATGATTGT ACAGAATCAT TGCTTATGAC ATGATCGCTT TCTACACTGT 3072

ATTACATAAA TAAATTAAAT AAAATAACCC CGGGCAAGAC TTTTCTTTGA AGGATGACTA 3132

CAGACATTAA ATAATCGAAG TAATTTTGGG TGGGGAGAAG AGGCAGATTC AATTTTCTTT 3192

AACCAGTCTG AAGTTTCATT TATGATACAA AAGAAGATGA AAATGGAAGT GGCAATATAA 3252
 GGGGATGAGG AAGGCATGCC TGGACAAACC CTTCTTTTAA GATGTGTCTT CAATTTGTAT 3312
 AAAATGGTGT TTTCATGTAA ATAAATACAT TCTTGGAGGA GC 3354

配列番号 : 2

配列の長さ : 4 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

40

配列番号 : 3

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Glu Ile Ser Glu Val Lys Met

5

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

配列番号：5

配列の長さ：6 9 5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

5

10

15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro

20

25

30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln

35

40

45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp

50

55

60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu

65

70

75

80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn

85

90

95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val

100

105

110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu

115

120

125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335

Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365
 Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
 370 375 380
 Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
 405 410 415
 Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
 420 425 430
 Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
 435 440 445
 Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
 450 455 460
 Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
 465 470 475 480
 Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
 485 490 495
 Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
 500 505 510
 Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
 515 520 525
 Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
 530 535 540

Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
 545 550 555 560
 Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
 565 570 575
 Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
 580 585 590
 Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 595 600 605
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 610 615 620
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
 625 630 635 640
 Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
 645 650 655
 His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
 660 665 670
 His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
 675 680 685
 Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 690 695

請 求 の 範 囲

1. (1) β -アミロイド前駆体蛋白質(APP)を産生し、(2) α -セクレターゼ活性を発現し、且つ(3)無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株。
2. 刺激下で検出可能な β -セクレターゼ活性を発現する請求項1に記載の細胞株。
3. 動物細胞である請求項1又は2に記載の細胞株。
4. ヒト巨核芽球系細胞由来である請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞株。
5. FERM BP-6287として寄託されている請求項4に記載の細胞株。
6. (1)請求項1に記載の細胞株にDNAライブラリーを導入し、(2)導入したDNAを発現させ、(3) β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択し、(4)選択された細胞から β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法。
7. 導入するDNAライブラリーがcDNAライブラリーである、請求項6に記載のクローニング方法。
8. cDNAライブラリーが哺乳動物細胞由来cDNAライブラリーである、請求項7に記載のクローニング方法。
9. cDNAライブラリーが脳由来cDNAライブラリーである、請求項8に記載のクローニング方法。
10. (1)無刺激下で請求項1に記載の細胞からDNAを調製し、(2)刺激下で請求項1に記載の細胞からDNAを調製し、(3)(1)で得られたDNAに存在せず且つ(2)で得られたDNAに存在するDNAクローンを得、(4) β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードす

るDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法。

11. 細胞から調製するDNAがcDNAである、請求項10に記載のクローニング方法。

12. 請求項6または10に記載のクローニング方法によって得られる β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

Fig.1

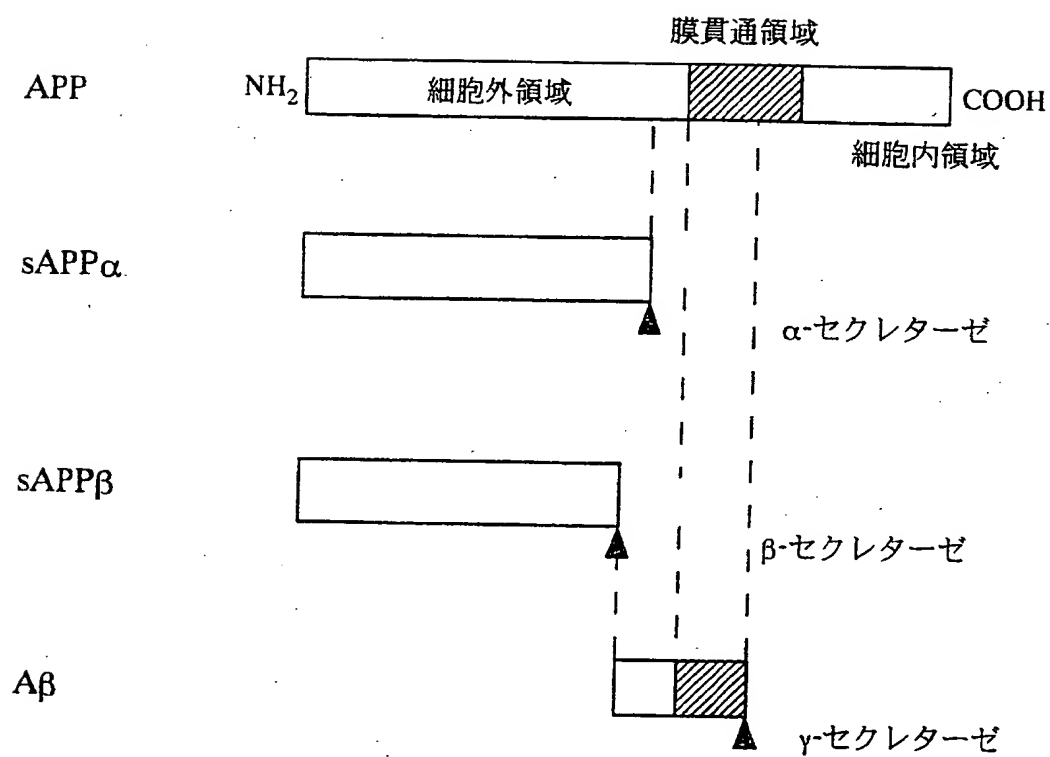


Fig. 2

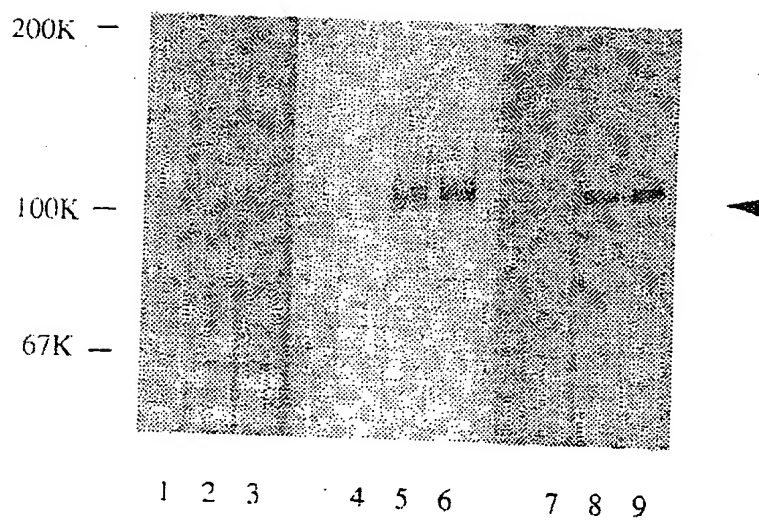
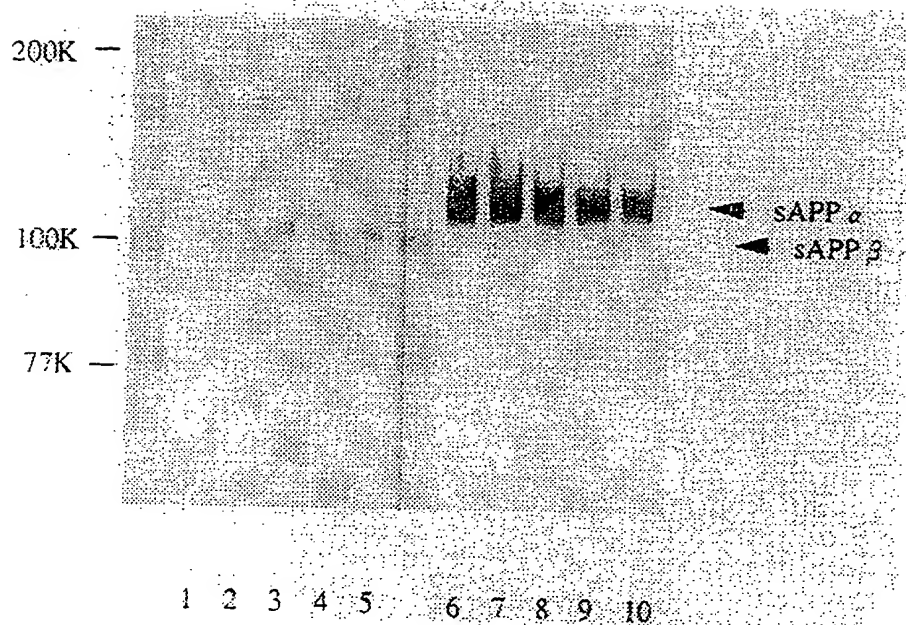


Fig.3

A



B

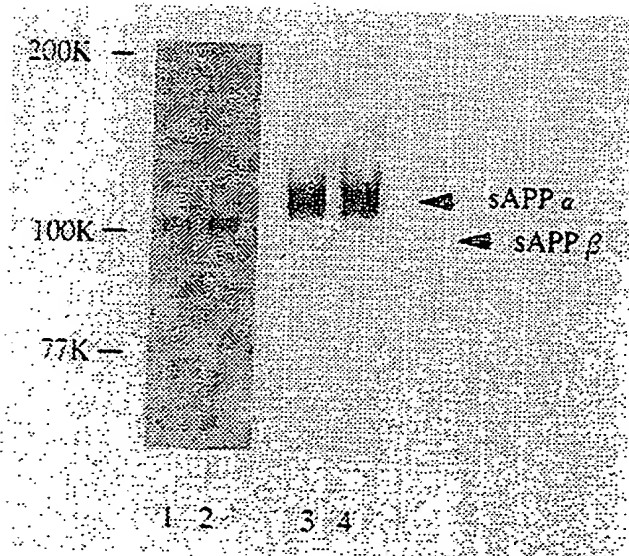


Fig.4

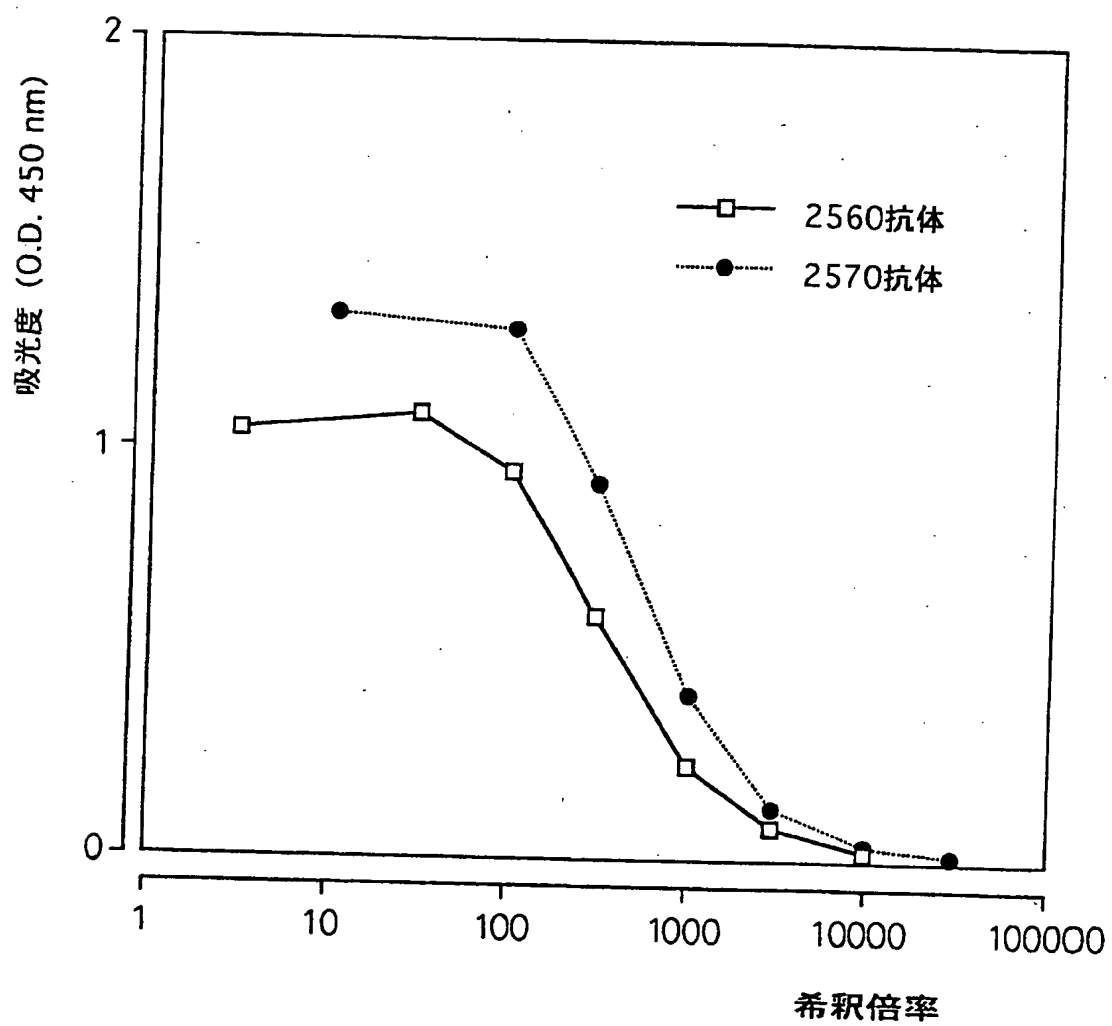
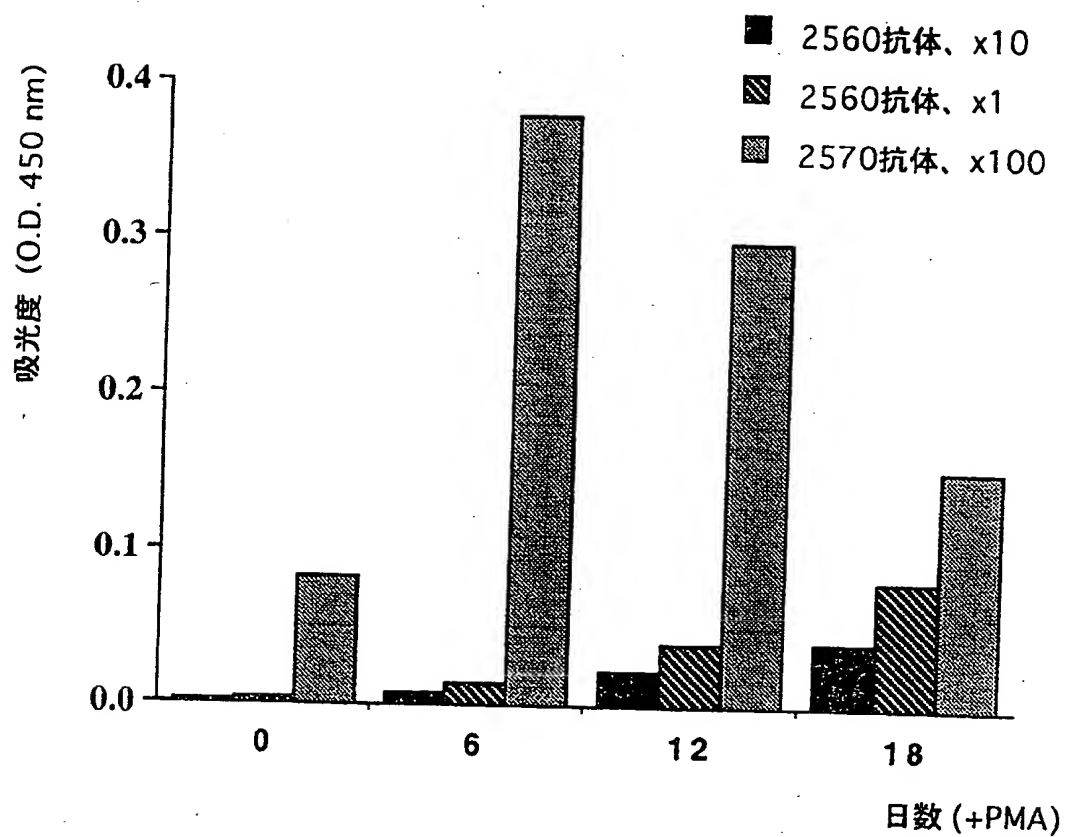


Fig. 5



SEQUENCE LISTING

<110> SUNTORY LIMITED

<120> Cell strain not expressing β -secretase activity

<130> F945

<150> JP 10-101821

<151> 1998-03-31

<160> 5

<210> 1

<211> 3354

<212> DNA

<213> Homosapiens

<223> Nucleotide sequence of cDNA coding for beta-amyloid precursor protein

<400> 1

agtttcctcg gcagcggtag gcgagagcac gcggaggagc gtgcgcgggg gccccgggag 60

acggcggcgg tggcggcgcg ggacagagcaa ggacgcggcg gatcccactc gcacagcagc 120

gcactcggtg ccccgcgag ggtcgcg atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg 174

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu

5

ctg gcc gcc tgg acg gct cgg gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat 222

Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn

10

15

20

25

gct ggc ctg ctg gct gaa ccc cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg 270

Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu

30

35

40

aac atg cac atg aat gtc cag aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca	318
Asn Met His Met Asn Val Gln Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser	
45 50 55	
ggg acc aaa acc tgc att gat acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc	366
Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys	
60 65 70	
caa gaa gtc tac cct gaa ctg cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac	414
Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn	
75 80 85	
caa cca gtg acc atc cag aac tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc	462
Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys	
90 95 100 105	
aag acc cat ccc cac ttt gtg att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag	510
Lys Thr His Pro His Phe Val Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu	
110 115 120	
ttt gta agt gat gcc ctt ctc gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac	558
Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His	
125 130 135	
cag gag agg atg gat gtt tgc gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc	606
Gln Glu Arg Met Asp Val Cys Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val	
140 145 150	
gcc aaa gag aca tgc agt gag aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc	654
Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly	
155 160 165	
atg ttg ctg ccc tgc gga att gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg	702
Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val	
170 175 180 185	

tgt tgc cca ctg gct gaa gaa agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg	750
Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala	
190 195 200	
gag gag gat gac tcg gat gtc tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat	798
Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr	
205 210 215	
gca gat ggg agt gaa gac aaa gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa	846
Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu	
220 225 230	
gtg gct gag gtg gaa gaa gaa gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag	894
Val Ala Glu Val Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu	
235 240 245	
gāt ggt gat gag gta gag gaa gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc	942
Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala	
250 255 260 265	
aca gag aga acc acc agc att gcc acc acc acc acc acc acc aca gag	990
Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu	
270 275 280	
tct gtg gaa gag gtg gtt cga gtt cct aca aca gca gcc agt acc cct	1038
Ser Val Glu Glu Val Val Arg Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro	
285 290 295	
gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat gag aat gaa cat	1086
Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His	
300 305 310	
gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc aag cac cga gag	1134
Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu	
315 320 325	

aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca gaa cgt caa gca 1182
 Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala
 330 335 340 345
 aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc cag cat ttc cag 1230
 Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln
 350 355 360
 gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac gag aga cag cag 1278
 Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln
 365 370 375
 ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg ctc aat gac cgc 1326
 Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg
 380 385 390
 cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg cag gct gtt cct 1374
 Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro
 395 400 405
 cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag tat gtc cgc gca 1422
 Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala
 410 415 420 425
 gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc gag cat gtg cgc 1470
 Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg
 430 435 440
 atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc cag gtt atg aca 1518
 Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr
 445 450 455
 cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct ctc tcc ctg ctc 1566
 His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu
 460 465 470

tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat gaa gtt gat gag 1614
 Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu
 475 480 485
 ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc ttg gcc aac atg 1662
 Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met
 490 495 500 505
 att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct ctc atg cca tct 1710
 Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser
 510 515 520
 ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc gtg aat gga gag 1758
 Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu
 525 530 535
 ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt ggg gct gac tct 1806
 Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser
 540 545 550
 gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt gat gcc cgc cct 1854
 Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro
 555 560 565
 gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct ggg ttg aca aat 1902
 Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn
 570 575 580 585
 atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat gca gaa ttc cga 1950
 Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg
 590 595 600
 cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gca 1998
 His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 605 610 615

gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga ctc atg gtg ggc 2046
 Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
 620 625 630
 ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg gtg atg ctg aag 2094
 Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys
 635 640 645
 aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg gag gtt gac gcc 2142
 Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala
 650 655 660 665
 gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg cag cag aac ggc 2190
 Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly
 670 675 680
 tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg cag aac 2232
 Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 685 690 695
 tagacccccg ccacagcagc ctctgaagtt ggacagcaaa accattgctt cactacccat 2292
 cgggtgtccat ttatagaata atgtgggaag aaacaaacce gttttatgat ttactcatta 2352
 tcgccttttg acagctgtgc tgtaacacaa gtagatgcct gaacttgaat taatccacac 2412
 atcagtaatg tattctatct ctctttacat ttgtgtctct atactacatt attaattgggt 2472
 tttgtgtact gtaaagaatt tagctgtatc aaactagtgc atgaatagat tctctcctga 2532
 ttatttatca catagcccct tagccagttg tatattatc ttgtggtttg tgaccaatt 2592
 aagtcctact ttacatatgc tttaagaatc gatgggggat gcttcatgtg aacgtgggag 2652
 ttcagctgct tctcttgcct aagtattcct ttctgatca ctatgcattt taaagttaaa 2712
 catttttaag tatttcagat gctttagaga gatttttttt ccatgactgc attttactgt 2772
 acagattgct gcttctgcta tttttgtgat ataggaatta agaggataca cacgtttgtt 2832
 tcttcgtgcc tgttttatgt gcacacatta ggcatgaga cttcaagctt ttcttttttt 2892
 gtccacgtat ctttgggtct ttgataaaga aaagaatccc tgttcattgt aagcactttt 2952

acggggcggg tggggagggg tgctctgctg gtcttcaatt accaagaatt ctccaaaaca 3012
 attttctgca ggatgattgt acagaatcat tgcttatgac atgacgcgtt tctacactgt 3072
 attacataaa taaattaaat aaaataaccc cgggcaagac ttttcttga aggatgacta 3132
 cagacattaa ataatcgaag taattttggg tggggagaag aggcagattc aattttcttt 3192
 aaccagtctg aagtttcatt tatgatacaa aagaagatga aaatggaagt ggcaatataa 3252
 ggggatgagg aaggcatgcc tggacaaacc cttcttttaa gatgtgtctt caatttgtat 3312
 aaaatggtgt tttcatgtaa ataaatacat tcttggagga gc 3354

<210> 2

<211> 42

<212> PRT

<213> Homosapiens

<223> A part of amino acid sequence of beta-amyloid precursor
 protein

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

40

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> An antigenic sequence for preparation of anti- sAPP β a
 ntibody

<400> 3

Glu Ile Ser Glu Val Lys Met

5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> An antigenic sequence for preparation of anti- sAPP α antibody

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

<210> 5

<211> 695

<212> PRT

<213> Homosapiens

<223> Amino acid sequece of beta-amyloid precursor protein

<400> 5

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

5

10

15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro

20

25

30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln

35

40

45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp

50

55

60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335
 Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365
 Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
 370 375 380
 Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
 405 410 415
 Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
 420 425 430
 Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
 435 440 445
 Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
 450 455 460
 Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
 465 470 475 480

Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn			
485	490	495	
Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser			
500	505	510	
Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr			
515	520	525	
Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln			
530	535	540	
Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn			
545	550	555	560
Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr			
565	570	575	
Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser			
580	585	590	
Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val			
595	600	605	
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys			
610	615	620	
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val			
625	630	635	640
Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile			
645	650	655	
His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg			
660	665	670	
His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys			
675	680	685	

WO 99/51752

PCT/JP99/01701

Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn

690

695

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/57, C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/00-15/90, C12N5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochimica et Biophysica Acta, 1359, 1997, p.110-122 Wei Zhang et al., "Characterization of beta-amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases"	1-12
A	The Journal of Biological Chemistry, 270(6), Feb. 1996, p.2419-2422 Sukanto Sinha et al., "Cell-type and Amyloid Precursor Protein-type Specific Inhibition of Abeta Release by Bafilomycin A1, a Selective Inhibitor of Vacuolar ATPases"	1-12
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199598316363, Arzneimittelforschung, 45(3A), 1995, p.435-438 Wurtman, R.J. et al., "Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor by first messengers: A novel potential approach for the treatment of Alzheimer's disease"	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
25 May, 1999 (25. 05. 99)

Date of mailing of the international search report
8 June, 1999 (08. 06. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01701

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199799521452, Molecular Medicine (New York), 3(3), 1997, p.204-211 Koo Edward, H., "Phorbol esters affect multiple steps in beta-amyloid precursor protein trafficking and amyloid beta-protein production"	1-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01701

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C12N 15/57, C12N 5/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C12N 15/00-15/90, C12N 5/00-5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochimica et Biophysica Acta, 1359, 1997, p. 110-122 Wei Zhang et al., "Characterization of beta-amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases"	1-12
A	The Journal of Biological Chemistry, 270(6), Feb. 1996, p. 2419-2422 Sukanto Sinha et al., "Cell-type and Amyloid Precursor Protein-type Specific Inhibition of Abeta Release by Bafilomycin A1, a Selective Inhibitor of Vacuolar ATPases"	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.05.99

国際調査報告の発送日 08.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199598316363, Arzneimittel-Forschung, 45(3A), 1995, p. 435-438 Wurtman, R. J. et al., "Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor by first messengers: A novel potential approach for the treatment of Alzheimer's disease"	1 - 1 2
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199799521452, Molecular Medicine (New York), 3(3), 1997, p. 204-211 Koo Edward, H., "Phorbol esters affect multiple steps in beta-amyloid precursor protein trafficking and amyloid beta-protein production"	1 - 1 2

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 C12N 15/57, 5/08	A1	(11) 国際公開番号 WO99/51752 (43) 国際公開日 1999年10月14日(14.10.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01701 (22) 国際出願日 1999年3月31日(31.03.99) (30) 優先権データ 特願平10/101821 1998年3月31日(31.03.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 小沢和春(OZAWA, Kazuharu)[JP/JP] 池田幸弥(IKEDA, Sachiya)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Sizuoka, (JP) 田平 武(TABIRA, Takeshi)[JP/JP] 〒207-0002 東京都東大和市湖畔2-1074-47 Tokyo, (JP) (74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: CELL LINE NOT EXPRESSING β -SECRETASE ACTIVITY		
(54)発明の名称 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株		
(57) Abstract		
A cell which produces a β -amyloid precursor protein, expresses the α -secretase activity and does not express the β -secretase activity in the absence of any stimulus but expresses the β -secretase activity under a stimulus. This cell is useful in cloning a DNA encoding a protein having the β -secretase activity.		

(57)要約

β -アミロイド前駆体蛋白質を産生し、 α -セクレターゼ活性を発現し、且つ無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しないが刺激下では β -セクレターゼ活性を発現する細胞。 β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAのクローニングのために有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シネラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BG ブルガリア	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BH バ레인	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BR ブラジル	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
CA カナダ	GR ギリシャ	MK マケドニア国	TM トルクメニスタン
CF 中央アフリカ	HR クロアチア	ML マリ	TR トルコ
CG コンゴ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CH スイス	ID インドネシア	MR モリタニア	UA ウクライナ
CI コートジボアール	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CM カメルーン	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CN 中国	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CR コスタ・リカ	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴイエトナム
CU キューバ	IT イタリア	NO ノールウェー	YU ユーゴスラビア
CY キプロス	JP 日本	NZ ニュー・ジールランド	ZA 南アフリカ共和国
CZ チェッコ	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
DE ドイツ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
	KR 韓国		

明 細 書

 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株

発明の分野

本発明は、 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株に関する。また、本発明は β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株を用いた β -セクレターゼをコードするcDNAのクローニング方法に関する。

背景技術

アルツハイマー病は、進行性の中樞神経系の変性疾患であり、神経細胞外に沈着する老人斑や神経細胞内の神経原線維変化を病理学的特徴とする痴呆症である。特に、老人斑はアルツハイマー病とダウン症候群においてのみ広範にみられ、疾患特異性が高い。アルツハイマー病では老人斑の量と痴呆が相関していることが知られている (Cummings, B. J. and Cotman, C. W. Lancet (1995) 346, 1524-1528)。

老人斑の主な構成成分としてアミノ酸39-42個のアミロイドペプチド(A β)が同定された (Genner, G. G. and Wong, C. W. Biochem, Biophys. Res. Commun. (1984)120, 885-890)。さらにA β の前駆体として β -アミロイド前駆体蛋白質 (β -amyloid precursor protein, APP) がクローニングされた (Kang, J. et al., Nature (1987) 325, 733-736)。APPは膜貫通部位を一箇所持つ、タイプIの膜蛋白であり、選択的スプライシングによりアミノ酸695、751及び770個からなるそれぞれAPP695、APP751及びAPP770の蛋白質をもたらす。A β はAPPのC末端近くに位置する。A β のN末端から28位のアミノ酸まではAPPの膜貫通部位の外側に、A

β の29位のアミノ酸からC末端まではAPPの膜貫通部位内にある。

APP遺伝子の変異が家族性アルツハイマー病において見出された (Goate, A. et al., Nature (1991) 349, 704-706、Mullan, M. et al., Nature Genet. (1992) 1, 345-347、Hendriks, L. et al., Nature Genet. (1992) 1, 218-221)。その変異の位置は $A\beta$ のN末端近傍またはC末端近傍あるいは $A\beta$ の内部に位置している。したがって、APPからの $A\beta$ の生成や脳内での $A\beta$ の沈着がアルツハイマー病の発症に深く関与することが考えられている。

APPの代謝経路には少なくとも2つの違う経路が存在することが知られている (Estus, S. et al., Science (1992) 255, 726-728)。第一は、APP695の612位のアミノ酸Lysと613位のアミノ酸Leuの間で切断される代謝経路である。この代謝経路では $A\beta$ ペプチドの内部のアミノ酸16位のアミノ酸と17位のアミノ酸間で切断され、 $A\beta$ の一部を含むAPPの分泌型N末端フラグメント (sAPP α) を生ずる。この代謝経路に係わるプロテアーゼ活性を α -セクレターゼ活性とよぶ。

第二は、APP695の596位のアミノ酸Metと597位のアミノ酸Aspの間と、APP695の638位のアミノ酸Alaと639位のアミノ酸Thrの間で切断される代謝経路である。この代謝経路では $A\beta$ の前後の位置で切断され、 $A\beta$ を含まないAPPの分泌型N末端フラグメント (sAPP β) と $A\beta$ が生成され、 $A\beta$ よりC末端側のフラグメントが膜上に残される。 $A\beta$ のN末端側を切断するプロテアーゼ活性を β -セクレターゼ活性とよび、 $A\beta$ のC末端側を切断するプロテアーゼ活性を γ -セクレターゼ活性とよぶ。

いくつかの培養細胞系 (teratocarcinoma P19 cell、embryonic kidney 293 cell) において、この2つの代謝経路によりsAPP α とsAPP β とがともに分泌されることが報告されている (Libin, H. et

al., J. Biol. Chem. (1996) 271, 30929-30934)。 β -セクレターゼ活性及び γ -セクレターゼ活性を介した第二の代謝経路により $A\beta$ が生成することより、アルツハイマー病の発症機序の解明や治療薬の開発を進める上でこの代謝経路を研究することは大切であると考えられている。

これまでに、APP の2 つ代謝経路に係わるプロテアーゼは何ら同定されていない。APP を $A\beta$ のN 末端付近で切断する活性を示す酵素として、キモトリプシン様プロテアーゼ (Nelson, R. B. et al., J. Neurochem. (1993) 61, 567-577) や、カテプシンD (Ladror, U.S. et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 18422-18428) などが報告されているが、 β -セクレターゼの実体は未だ解明されていない。

これまでに報告された細胞株は、いずれも α -セクレターゼ活性及び β -セクレターゼ活性をともに有するが、 α -セクレターゼ活性のみ有し、 β -セクレターゼ活性を有さない細胞株は知られていなかった。

発明の開示

本発明は、 β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株を提供しようとするものである。本発明はまた、 β -セクレターゼ遺伝子をクローニングする方法を提供しようとするものである。

すなわち、本発明は、(A) (1)APP を産生し、(2) α -セクレターゼ活性を発現し、且つ (3)無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株を提供する。本細胞株は、好ましくは刺激下で検出可能な β -セクレターゼ活性を発現する。本細胞株は、好ましくは動物細胞株である。本細胞株は、より好ましくは哺乳動物細胞株である。哺乳動物としては、好ましくはヒトである。本細胞株は、好

ましくは巨核芽球系細胞由来である。

本発明はまた、(B)(1)(A)の細胞株にDNAライブラリーを導入し、(2)DNAを発現させ、(3) β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択し、そして(4)選択された細胞から β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法を提供する。導入するDNAライブラリーは、好ましくはcDNAライブラリーである。cDNAライブラリーは、好ましくは哺乳動物細胞由来cDNAライブラリーである。また、cDNAライブラリーは、好ましくは脳由来cDNAライブラリーである。

本発明はまた、(C)(1)無刺激下で(A)の細胞からDNAを調製し、(2)刺激下で(A)の細胞からDNAを調製し、(3)(1)で得られたDNAに存在せず且つ(2)で得られたDNAに存在するDNAクローンを得、(4) β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法を提供する。調製するDNAは、好ましくはcDNAである。

本発明はまた、(D)上記(B)または(C)に記載のクローニング方法によって得られる β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを提供する。

図面の簡単な説明

図1は、 α -セクレターゼ、 β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼのAPPに対するプロテアーゼ活性を模式的に示す。上向きの黒三角印は切断部位を示す。

図2は、巨核芽球系細胞の培養上清中のsAPPについて、ウェスタン分析を行った結果を示す図である。縦軸の数値は分子量を、矢印

はsAPPの位置を表わす。

図3は、ホルボールエステル刺激した巨核芽球系細胞の培養上清中のsAPPについて、ウェスタン分析を行った結果を示す図である。AはMK/AP8細胞の結果を、BはMK/NL細胞の結果を示す。縦軸の数値は分子量を表わす。

図4は、SH-SY5Y細胞の培養上清中のsAPPについて、エンザイムイムノアッセイを行った結果を示す。縦軸は450ナノメートルの吸光度を、横軸は培養上清の希釈倍率を表わす。

図5はホルボールエステル刺激した巨核芽球系細胞の培養上清中のsAPPについて、エンザイムイムノアッセイを行った結果を示す。縦軸は450ナノメートルの吸光度を、横軸はホルボールエステル刺激の日数を表わす。

発明の実施の形態

本発明は、(A)(1)APPを産生し、(2) α -セクレターゼ活性を発現し、且つ(3)無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株に関する。本発明の細胞株は、無刺激の状態では β -セクレターゼ活性を発現しないが、分化誘導剤、例えばホルボールエステル、インターロイキン-3(IL-3)、レチノイン酸等で刺激すると β -セクレターゼ活性を発現する。刺激された本発明の細胞株は、検出可能な β -セクレターゼ活性を発現する。また、本発明の細胞株は γ -セクレターゼ活性を発現していてもよい。

本発明の細胞株は、動物等に由来する細胞株であるが、好ましくは動物細胞株である。動物細胞株としては、好ましくは哺乳動物由来の細胞株である。哺乳動物としては、好ましくはヒト由来細胞株である。本発明の細胞株は、上述した性質を有する限りいずれの器官、組織、臓器由来であってよいが、好ましくは巨核芽球系細胞由

来である。

なお、本発明の細胞株の性質を有する巨核芽球系細胞株MK/AP8は、平成10年（1998年）3月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-6287として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明の細胞株は天然にAPPを産生してもよいし、遺伝子工学的に操作されたことによりAPPを産生してもよい。本発明の細胞株は、好ましくは遺伝子工学的に操作されてAPPを産生する細胞株である。

本細胞株が産生するAPP（ β -アミロイド前駆体蛋白質）は、選択的スプライシングにより、主に全長が695、751又は770からなるそれぞれAPP695、APP751及びAPP770をもたらすことが知られている。本発明の細胞株は、 $A\beta$ のアミノ酸配列を含有する限りいずれのAPPを産生するものであってもよい。APPとして、例えば695個のアミノ酸残基からなるAPP695のアミノ酸配列および対応する塩基配列を配列番号：1に示し、そのアミノ酸配列のみを配列番号：5に示す。APP695は、625位のアミノ酸Glyから648位のアミノ酸Leuまでが膜貫通領域である。

APPは一部の家族性アルツハイマー病（familial Alzheimer's disease, FAD）の発症に関連する点突然変異（FAD変異）を有することが知られている。FAD変異としては、APP695の場合、FAD二重変異として595位のアミノ酸LysがAsn、596位のアミノ酸MetがLeu、FAD変異として642位のアミノ酸ValがPhe、GlyまたはIleのいずれか、及び $A\beta$ の内部のFAD変異として617位のAlaがGlyに変化している。しかしながら、本発明の細胞株が産生するAPPとしては、これらの全て又は一部の変異を有するAPPであってよい。

本発明において、本発明の細胞株が産生するAPPは、 α -セクレターゼ活性によりsAPP α を生成し、刺激された状態で発現する β -セクレターゼ活性によりsAPP β を生成する生物学的活性を有する蛋白質である。したがって、本発明の細胞株が産生するAPPは、配列番号：1又は5に示すアミノ酸配列において18位のアミノ酸Leuから695位のアミノ酸のAsnまでのアミノ酸配列を有し、且つAPPの生物学的活性を有する蛋白質であれば、いかなるものであってもよい。なお、配列番号：1又は5において、1位のアミノ酸Metから17位のアミノ酸Alaまではシグナル配列である。また、APPは、配列番号：1において18位のアミノ酸Leuから695位アミノ酸のAsnまでのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するAPPであってよい。

APPは、配列番号：1又は5において591位のアミノ酸Ileから648位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列を有していればその生物学的活性を示すと考えられる。したがって、本発明に使用されるAPPは、配列番号：1又は5において591位のアミノ酸Ileから648位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列を含み、かつ18位のアミノ酸Leuから590位のアミノ酸Glu及び649位のアミノ酸Metから695位のアミノ酸Asnまでのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するAPPであってよい。また、APPは配列番号：1又は5において、1位のアミノ酸Metから17位のアミノ酸Alaまでのアミノ酸配列又はこのアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列がN末端に付加していてもよい。

さらにAPPは、その生物学的活性を有する限り、配列番号：1又

は5 において591 位のアミノ酸Ile から648 位のアミノ酸Leu までのアミノ酸配列に対する1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するAPP であってよい。

これらのAPP は、他の膜蛋白質とAPP のキメラ構造のアミノ酸配列を有していてもよい。なお、配列番号：1 又は5 に示すAPP695の597 位のアミノ酸Asp から638 位のアミノ酸Ala までの42アミノ酸残基からなるアミノ酸配列は A β に該当する。

あるアミノ酸配列に対する1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acid s Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

本発明の細胞株が産生するAPP は、由来する種、それらを産生する宿主及び／又は精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖付加の有無や糖鎖付加の位置、糖鎖の構造、リン酸化状態及び／又はジスルフィド結合の有無が異なる。しかしながら、本発明の細胞株が産生し得る限り、いかなる構造を有するAPP であってよい。APP が由来する種としてはヒトが好ましい。

本発明の細胞株が産生するAPP はまた、他のペプチド又はポリペプチドと融合した上記APP であってよい。これら融合ポリペプチドを作製する方法は、すでに公知の手法を用いることができる。APP との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、本発明の細胞株が産生する限りいかなるペプチド又はポリペプチドであ

ってよい。

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。またポリペプチドとしては、例えばGST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。市販されているこれらをコードするDNAを融合させたものを用いることができる。

本発明の細胞株が産生するAPPをコードするDNAとしては、配列番号: 1 に示す塩基配列の148位の塩基Aから2235位の塩基Gからなる塩基配列が挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPPをコードするDNAとしては、各々配列番号: 1 に示す塩基配列を有するDNAであれば、いかなる由来のDNAであってよい。このようなDNAとして、例えばジェノミックDNA、cDNA、合成DNAが挙げられる。これらは、種々の細胞、組織又は臓器あるいはヒト以外の種から得られたcDNAライブラリー、ジェノミックライブラリーから得られたDNAであってよい。

本発明の細胞株が産生するAPPをコードするDNAは、上述のように遺伝子組換え技術を用いて単離することができる。例えば、組換え蛋白質は、本明細書に記載されたAPPの遺伝子の塩基配列をそれらを発現する細胞、組織、又は臓器からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることができる。

具体的には、APP を発現する細胞、組織、又は臓器から、その遺伝子をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、A G P C法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて遺伝子のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業製)等を用いて行うこともできる。また、cDNAの合成および増幅を行うにはMarathon cDNA Amplification kit(CLONTECH製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction ; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 8998-9002、Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。目的とするDNAが得られれば、これを発現ベクターへ組み込む。

本発明の細胞株が産生するAPPをコードするDNAとしては、配列番号：1に示す塩基配列に対しハイブリダイズし、且つその生物学的活性を有するAPPをコードするDNAであってもよい。APPをコー

ドするDNA がハイブリダイズする条件としては、適度なストリンジェンシー条件下においてハイブリダイズするDNA が挙げられる。

このようなハイブリダイズ条件としては、例えば低ストリンジェンシーな条件が挙げられる。低ストリンジェンシーな条件としては、例えば42℃、5 × SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムにより与えられる洗浄条件である。より好ましくは、高ストリンジェンシーな条件が挙げられる。高ストリンジェンシーな条件としては、例えば60℃、0.1 × SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムにより与えられる洗浄条件である。ある蛋白質をコードする塩基配列に対し、適度な条件でハイブリダイズするDNA がコードする蛋白質がその蛋白質と同じ生物学的活性を有することはすでに知られている。

本発明の細胞株が産生するAPP をコードするDNA は、以上に述べたDNA を市販のキットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNA フラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終始コドン (ATT、TGA 又はTAG) の挿入等が挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPP の発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウィルス由来の発現ベクター、例えばpHSV、pMV、酵母由来の発現ベクター、例えばpNV11、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2が挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPP の発現ベクターには、例えばAPP

をコードするDNAを、発現ベクターの中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。プロモーター／エンハンサーとしては、哺乳動物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばEF1- α プロモーター／エンハンサー、 γ -アクチンプロモーター／エンハンサー、昆虫ウィルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えば多核体（ポリヘドリン）ウィルスプロモーター／エンハンサー、植物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばタバコモザイクウィルスプロモーター／エンハンサー、動物ウィルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えばSV40プロモーター／エンハンサー、ヒトCMVプロモーター／エンハンサー、酵母由来のプロモーター／エンハンサー、例えばアルコール脱水素酵素プロモーター／エンハンサー、大腸菌由来のプロモーター／エンハンサー、例えばLacプロモーター／エンハンサー、Trpプロモーター／エンハンサー、Tacプロモーター／エンハンサーが挙げられる。

本発明の細胞株が産生するAPPの発現には、発現に用いられる宿主に適したシグナル配列を付加して使用してもよい。シグナル配列としては、例えば分泌蛋白質のシグナル配列が挙げられる。分泌蛋白質のシグナル配列としては、例えば哺乳動物由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばイムノグロブリンのシグナル配列が挙げられる。また分泌蛋白質のシグナル配列としては、大腸菌由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばOmpA等のペリプラズム分泌シグナル配列が挙げられる。

このように作製した発現ベクターは、公知の方法により宿主に導入することができる。宿主への導入の方法としては、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、リボソーム法が挙げられる。

発現ベクターの複製開始点としては、SV 40、ポリオーマウィル

ス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものをを用いることができる。また、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を含むことができる。また、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-r74)。

本発明の細胞株は、任意の細胞株を使用することができる。このような細胞株としては、真核細胞が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞がある。動物細胞としては、(1) 哺乳動物細胞、例えば CHO (J. EAPPP. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、巨核芽球系細胞、(2) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

植物細胞としては、ニコシアナ・タバクム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (Aspergillus) 属、例えばア

スペルギウス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

これらの細胞をAPP をコードする遺伝子を含む発現ベクターにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりAPP を産生する細胞が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は約 6-8 であるのが好ましい。培養は通常約 30-40 °C で約 15-200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

APP の代謝経路は、(1) α -セクレターゼによる切断でAPP の可溶性N 末フラグメント (sAPP α) を生じる経路と (2) β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼによりAPP の可溶性N 末フラグメント (sAPP β) と A β を生じる経路がある。

α -セクレターゼは、APP695の612 位のアミノ酸Lys と613 位のアミノ酸Lys の間を切断し、sAPP α を生じさせる活性を持つ。通常の細胞は α -セクレターゼ活性を有する。

β -セクレターゼは、A β のN 末端側を切り出す活性を有する。 β -セクレターゼは、APP695の596 位のアミノ酸Met と597 位のアミノ酸Asp の間を切断し、sAPP β を生じさせる活性を持つ。 β -セクレターゼによるAPP の切断部位は決まっている。 β -セクレターゼは γ -セクレターゼと共にAPP に作用することにより A β を生じさせる。通常の細胞には β -セクレターゼ活性がある。なお、APP が α -セクレターゼで切断されると β -セクレターゼはAPP に作用しない。

γ -セクレターゼは、A β のC 末端側を切り出す活性を有する。 γ -セクレターゼ活性は、切断部位が前後することが知られており、したがって切り出される A β のC 末端のアミノ酸は不均一である

。従って、 γ -セクレターゼとして複数の酵素が存在する可能性がある。 γ -セクレターゼの一例として、APP695の638 位のアミノ酸 Thr と639 位のアミノ酸 Val の間を切断し、sAPP β と A β とを含むポリペプチドを生じさせる活性を持つものが知られている。 γ -セクレターゼは、 β -セクレターゼと共に作用することによりAPP から A β を生じさせる。通常の細胞には γ -セクレターゼ活性がある。

α -セクレターゼ、 β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼのAPP に対するプロテアーゼ活性を図1 に模式的に示す。

A β は、APP から切り出されるアミノ酸39-42 個のペプチドである。 β -セクレターゼにより切り出されるN 末端は決まっているが、 γ -セクレターゼにより切り出されるC 末端は不均一である。したがって、アミノ酸残基の数が異なる A β が知られているが、本発明ではいずれのアミノ酸残基数を持つものであってもよい。アミノ酸残基数42の A β のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。

本発明は、(1)上述の細胞株にDNA ライブラリーを導入し、(2)導入したDNA を発現させ、(3) β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択し、(4)選択された細胞から β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA を単離する、ことからなる β -セクレターゼをコードするDNA のクローニング方法に関する。

導入されるDNA ライブラリーは、種々の細胞、組織又は臓器から得られたcDNAライブラリーまたはジェノミックDNA ライブラリーであってよい。これらのDNA ライブラリーは、市販のDNA ライブラリーであってよい。これらライブラリーに用いられるベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、YAC ベクター等いかなるものであってもよい。

cDNAライブラリーを作成するには、具体的には所望の細胞、組織

、又は臓器からmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業製)等を用いて行うこともできる。また、cDNAの合成および増幅を行うにはMarathon cDNA Amplification kit(CLO NTECH製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; RCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。

得られたPCR産物からcDNA断片を調製し、所望の発現ベクターDNAと連結すればよい。

cDNAライブラリーは、哺乳動物由来のcDNAライブラリーが好ましい。哺乳動物由来の細胞、器官、組織、臓器からcDNAライブラリーを取得する。哺乳動物としては、好ましくはヒトである。cDNAライブラリーの単離源としては、好ましくはヒト脳である。

β -セクレターゼ活性とは、上述のとおり、APPからsAPP β を切り出す活性である。したがって、 β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択するには、細胞の培養上清中のsAPP β を検出又は測定すればよい。sAPP β は、精製した状態であるいは粗精製の状態で検出又は測定することができる。

初めに精製された又は粗精製されたsAPP β を支持体に結合させる。sAPP β を支持体に結合させる際に標準的な方法でsAPP β を支持体に結合させることができる。sAPP β を結合させる支持体としては、例えば不溶性の多糖類、例えばアガロース、デキストラン、セルロース、合成樹脂、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等が挙げられる。より具体的にはそれらを原料として製造される市販のビーズ、プレートが用いられる。ビーズの場合、これらが充填されたカラム等を用いてもよい。プレートの場合、マルチウェルプレート（96穴マルチウェルプレート等）やバイオセンサーチップが挙げられる。

sAPP β と支持体との結合は、化学結合、物理的な吸着等、通常用いられる方法により結合すればよい。また、sAPP β を特異的に認識する抗体を予め支持体に結合せしめ、この抗体とsAPP β とを結合させることにより結合することもできる。さらに、アビジン／ビオチンを介して結合させることができる。

sAPP β の検出又は測定は、通常緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、Tris緩衝液等が使用される。また、インキュベートの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば4℃～室温にて1時間～24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、sAPP β と支持体との結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば界面活性剤を含む緩衝液が使用される。界面活性剤としては、例えば0.05%Tween 20 が使用される。

sAPP β を検出又は測定するには、適切な条件下でインキュベート及び洗浄することにより、特異的な結合と非特異的な結合を分離することができる。そして、sAPP β を検出又は測定すればよい。本方法において、試料中のsAPP β を検出又は測定する群と共にコントロー

ル群を設置してもよい。コントロール群としては、sAPP β を含まない陰性コントロール群又はsAPP β を含む陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。

本発明においてsAPP β を検出又は測定する際、単にsAPP β を検出するだけでもよいし、又はsAPP β を定量的に測定してもよい。これらの場合、sAPP β を含まない陰性コントロール群で得られた結果、試料で得られた結果及び／又はsAPP β を含む陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、目的のsAPP β を検出することができる。

これらの結果を数値として得、それらの数値を比較することにより、sAPP β を定量的に測定することができる。また、定量的に測定する場合、sAPP β を既知量含む陽性コントロール群で得られた数値により作成された標準曲線を元に定量することができる。

本方法において、sAPP β を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することができる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは蛋白質-蛋白質間の相互作用を微量の蛋白質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore ; Pharmacia 製）。したがって、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることによりsAPP β を検出又は測定することが可能である。

すなわち、sAPP β を含む試料を固定化したセンサーチップに、sAPP β を検出するための抗体を接触させ、固定化したsAPP β に結合する抗体を共鳴シグナルの変化として検出しようとするものである。具体的には以下のように行えばよい。初めにセンサーチップCM5（Biosensor 製）を活性化して培養上清中のsAPP β をセンサーチップ上に固定化する。すなわち、EDC / NHS 水溶液（200mM EDC（N-エ

チル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カーボネート塩酸塩), 50 mM NHS (N-hydroAPPysuccinimide)) によりセンサーチップを活性化した後、HBS バッファー (10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.05%Tween20) によりセンサーチップを洗浄する。

次にHBS バッファーに溶解した適量のsAPP β を特異的に認識する抗体をセンサーチップに接触させ、固定化する。HBS バッファーによりセンサーチップを洗浄後、エタノールアミン溶液 (1Mエタノール アミン塩酸塩, pH8.5)によりセンサーチップ上の残存活性基をブロックする。再びHBS バッファーによりセンサーチップを洗浄する。

次にHBS バッファーに溶解した適量のsAPP β を特異的に認識する抗体を注入する。このときにセンサーチップに固定化されたsAPP β に結合するsAPP β を特異的に認識する抗体の量は共鳴シグナル値の増加として観察される。このとき、コントロール群を設置してもよい。コントロール群としてはsAPP β を含まない陰性コントロール群又はsAPP β を含む陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。

センサーチップに結合したsAPP β に結合した抗sAPP β 抗体は共鳴シグナル値の変化量として定量的に測定することができる。この場合、sAPP β を含まない陰性コントロール群で得られた結果及び/又はsAPP β を含む陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、sAPP β を検出、決定することができる。

sAPP β の検出又は測定において、結合した蛋白質を検出又は測定する手段として、sAPP β を標識しその標識を検出又は測定することができる。

例えば、sAPP β の検出又は測定において、sAPP β を特異的に認識する抗体をあらかじめ標識しておき、sAPP β とインキュベートした

後、洗浄して結合している sAPP β を特異的に認識する抗体をその標識により検出又は測定する。

sAPP β を特異的に認識する抗体は、通常知られる方法により標識されることができる。標識物質としては、例えば放射性同位元素、酵素、蛍光物質、ビオチン／アビジン等が挙げられる。これらの標識物質は市販の標識物質を使用することができる。放射性同位元素としては、例えば ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S が挙げられる。酵素としては、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ等が挙げられる。蛍光物質としては、例えばフロオロセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンが挙げられる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、sAPP β を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えば BSA でブロッキングする。再び洗浄し、sAPP β を特異的に認識する抗体をプレートに加える。同時に sAPP β を含まない群（陰性コントロール）及び／又は既知濃度の sAPP β を加えた群（陽性コントロール）を置き、これらをインキュベートする。

インキュベートの後、洗浄し結合した抗体を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すれば sAPP β を検出又は測定することができる。sAPP β を検出又は測定する手段として、sAPP β を特異

的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体を用いることができる。

例えば、sAPP β を含む試料とともにsAPP β を特異的に認識する抗体を接触させ、インキュベートした後、洗浄して結合しているsAPP β を特異的に認識する抗体をそれを特異的に認識する二次抗体により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させたsAPP β にsAPP β を特異的に認識する抗体を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合しているsAPP β を特異的に認識する抗体をそれを特異的に認識する二次抗体により検出又は測定すればよい。二次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、sAPP β を含む溶液をプレートに加え、一夜放置する。プレートを洗浄の後、蛋白質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、sAPP β を特異的に認識する抗体をプレートに加える。同時にsAPP β を含まない群（陰性コントロール）及び／又は既知濃度のsAPP β を加えた群（陽性コントロール）を置き、これらをインキュベートする。

インキュベートの後、洗浄しsAPP β を特異的に認識する抗体に対する二次抗体を加える適度なインキュベーションの後、洗浄して、そのsAPP β を特異的に認識する一次抗体を特異的に認識する二次抗体によりsAPP β を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的变化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値を比較すればsAPP β を検出又は／測定することができる。

より詳しくは、本発明は特に好ましくはELISA（Enzyme-linked

Immunosorbent Assay) により次のようにして行うことができる。細胞の培養上清中の sAPP β を検出又は測定するには、例えばサンドイッチ型の ELISA による検出又は測定を行えばよい。96 穴イムノプレートに sAPP β を特異的に認識し sAPP α を認識しない抗体を加え、4 °C にて一晚インキュベートして抗体をプレートにコートする。次にプレートを PBS (Phosphate Buffered Saline) 等で洗浄し、25 % ブロックエースと 7 ~ 10 時間インキュベートし、蛋白質の非特異的な結合を防ぐためにブロッキングを行う。

次いで、細胞の培養上清サンプルと APP の N 末端を特異的に認識する一次抗体を加え 4 °C にて一晚インキュベートする。インキュベート後、プレートを PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と室温で 1 時間インキュベートする。その後、ペルオキシダーゼの基質を用いて室温 10 分間発色させ、マイクロプレートリーダー (バイオ ラット製) で吸光度を測定する。

sAPP β の検出又は測定は、High Throughput Screening (HTS)) にも使用することができる。具体的には、ブロッキングまでを手作業で行い、その後の反応はロボットによって行うことでオートメーション化し、High Throughput Screening を実現することができる。すなわち、sAPP β を含む溶液を固相化バッファー (0.1 M NaHCO₃、0.02% NaN₃、pH9.6) により希釈する。96 穴のイムノプレート (Nunc 製) の各穴に希釈したこの水溶液を適量加え 4 °C で一晚インキュベートする。

洗浄バッファー (PBS に 0.05% Tween20 となるよう調製したもの) で 3 回各穴を洗浄後、PBS に溶解した 5% BSA (SIGMA 製) 溶液 200 μ l を加え、4 °C で一晚ブロッキングする。次に、例えば Biomek 2000 HTS system (Beckman 製) にブロッキング済みのイムノプレートをセットしてシステムのコントロールプログラムを実行する。こ

の際、分注機としてはBiomek 2000 分注機(Beckman製)あるいはMultipipette96穴同時分注器(Sagian 製)を用いることでイムノプレート各穴への溶液の分注や溶液の除去を行うことができる。

また、イムノプレートの各穴の洗浄にはEL404 マイクロプレートウォッシャー(Bio Tek製)を用いることができる。また、吸光度の測定にはSPECTRAMaAPP250 プレートリーダー(Molecular Devices製)を用いることができる。

プログラムは以下の操作をおこなうよう設定する。すなわち洗浄バッファーで3 回各穴を洗浄し、sAPP β を特異的に認識する抗体を希釈バッファー(1% BSA、0.5% Tween20、PBS)で希釈する。同時にsAPP β を含まない群(陰性コントロール)及び既知濃度のsAPP β を加えた群(陽性コントロール)を置き、これらを室温で1 時間インキュベートする。

洗浄バッファーで各穴を3 回洗浄し、希釈バッファーで5000倍に希釈したウサギ抗sAPP β 抗血清を100 μ l 各穴に加え、室温で1 時間インキュベートする。洗浄バッファーで各穴を3 回洗浄し、希釈バッファーで 5000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG 抗体(TAGO製)を 100 μ l 各穴に加え、室温で1 時間インキュベートする。

洗浄バッファーで5 回各穴を洗浄し、発色溶液(基質バッファー; 50 mM NaHCO₃、10mM MgCl₂、pH9.8 に 1 mg/mlの濃度に溶解したp-ニトロフェニルフォスフェート(Sigma 製))を 100 μ l 各穴に加え、室温で反応させた後に 405 nm での吸光度をマイクロプレートリーダー、Biomekプレートリーダー(Beckman / Molecular Devices製)を用いて測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値と比較すればsAPP β を検出又は測定することができる。

sAPP β を検出又は測定するために使用される抗体は、市販の抗体

や市販のキットに含まれる抗体を用いることもできるし、公知の手段を用いてモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体として得ることができる。

ポリクローナル抗体を得るには、感作抗原を動物に免疫し、動物の血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。このようにして所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる。また、所望の結合活性を有するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、 Fab 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 又はH鎖とL鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv ($scFv$) が挙げられる。

前記のように得られた抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製

は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

上記で得られた抗体の濃度測定又は活性確認は、公知の方法、例えばELISA、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。

上記のように得られた一次抗体又は二次抗体は、通常知られる方法により標識されることができる。標識物質としては、例えば放射性同位元素、酵素、蛍光物質等が挙げられる。これらの標識物質は市販の標識物質を使用することができる。放射性同位元素としては、例えば ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S が挙げられる。酵素としては、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ等が挙げられる。蛍光物質としては、例えばフロオロセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンが挙げられる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

本発明は、(1)無刺激下で本発明の細胞株からDNAを調製し、(2)刺激下で本発明の細胞株からDNAを調製し、(3)(1)で得られたDNAに存在せず且つ(2)で得られたDNAに存在するDNAクローンを得、(4) β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことからなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法に関する。細胞から調製するDNAは、好ましくはcDNAである。cDNAの調製方法は本明細書に記載した方法にしたがえばよい。

本発明の細胞株の刺激は、細胞分化誘導物質を使用することができる。細胞分化誘導物質として、好ましくはホルボールエステル、IL-3、レチノイン酸等を使用することができる。

無刺激下で調製されたDNA に存在せず且つ刺激下で調製されたDNA に存在するDNA クローンを得るには、刺激下で調製されたDNA と無刺激下で調製されたDNA とにともに存在するDNA を除去すればよい。刺激下で調製されたDNA と無刺激下で調製されたDNA とにともに存在するDNA を除去するには、ディファレンシャルクロニング法 (Lau, L.F. et al., and Nathans, D. EMBO J. (1985) 4, 3145-3151), ディファレンシャルディスプレイ法 (Liang, P. and Pardee, A.B. Science (1992) 257, 967-971)、サブトラクティブクロニング法 (Hedrick, S.M. et al., Nature (1984) 308, 149-153) 又はシリアルアナリシスジーンエクスペッション法 (SAGE法) (Velculescu, V.E. et al., Science (1995) 270, 484-487) 等を使用することができる。

ディファレンシャルクロニング法は、刺激下で得られたcDNAライブラリーを標識し、標識したcDNAライブラリーをファージに導入し、これを細胞、例えばE. coli等に感染させ、プレートにまく。生じたプラークを2枚の膜、例えばニトロセルロース膜等に写し取り、各々の膜を無刺激下で得られたcDNAと刺激下で得られたcDNAとでハイブリダイズさせる。刺激下で特異的にハイブリダイズし、無刺激下でハイブリダイズしないプラークからcDNAを単離すればよい。

ディファレンシャルディスプレイ法は、無刺激下で得られたcDNAライブラリーと刺激下で得られたcDNAライブラリーそれぞれをテンプレートとし、数種類のオリゴdTアンカードプライマーと数種類のランダムプライマーの組み合わせによるPCR 反応を行ったのち、それぞれから生成するPCR 産物をゲル電気泳動によって分離する。無刺激及び刺激間において、分離されたPCR 産物、即ちバンドの出現パターンを詳細に比較し、無刺激では存在せず刺激下で存在するバンド或いは無刺激に較べ刺激下で増加する (バンドのシグナル強度

が増加する) バンドを同定、単離し、この DNA断片から全長 cDNA を単離すればよい。

サブトラクティブクローニング法は、無刺激下で得られた cDNA をビオチン等で標識し、刺激下で得られた cDNA とをハイブリダイズさせる。次いで、ハイブリダイズした cDNA を対応する標識、例えばアビジン等により除去する。これを繰り返して、刺激下で特異的に存在し、無刺激下で存在しない cDNA を単離すればよい。このようにして得られた cDNA クローンを適切な細胞に導入し、上述の sAPP β を検出又は測定する方法にしたがって β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA を単離すればよい。

シリアルアナリシスジーンエクспレッション法は、上記参考論文に記載されているような方法を用いることができる。シリアルアナリシスジーンエクспレッション法により、無刺激下及び刺激下の細胞において発現している遺伝子、即ち mRNA の存在比率をおのこの遺伝子断片の塩基配列の出現頻度として知ることができる。この遺伝子の出現頻度を無刺激と刺激間で比較し、無刺激では存在せず刺激下でのみで存在する配列或いは無刺激に較べ刺激下で出現頻度が増加する配列を同定し、それらをもとに cDNA を単離すればよい。

実施例

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1. APP 発現ベクターの構築

APP695、あるいは家族性アルツハイマー病で発見された二重変異を導入した APP695 (APP695NL) の cDNA を、哺乳動物細胞発現ベクターである pCEP4 (インビトロゲン製、カルフォルニア)

のマルチクローニングサイトに組み込むことによりAPP 発現ベクターを作成した。

APP695NLのcDNAは、Trans former Site-Directed Mutagenesis キット（クロンテック製）を用いて、APP695のcDNAの595位のアミノ酸リジンをアスパラギンに、また596位のアミノ酸メチオニンをロイシンに変えることにより作成した。

実施例2. APP発現クローンの作成

ヒトの巨核芽球系細胞は10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640中で、またヒトのニューロblastomaであるSH-SY5Y細胞は10%ウシ胎児血清を含むDMEM/F-12中で維持した。巨核芽球系細胞はLipofectamine（ギブコ製）を用い、またSH-SY5Y細胞はリン酸カルシウムトランスフェクションシステム（ギブコ製）を用い、APP 発現ベクターを細胞に導入した。遺伝子を導入した細胞はハイグロマイシンB（和光純薬工業製）により選択を行い、各発現クローン細胞を得た。巨核芽球系細胞APP 発現クローンは、MK/AP8, MK/AP9細胞と名付けられた。また、変異を含むAPPを発現する巨核芽球系細胞クローンは、各々MK/NL2、MK/NL10細胞と名付けられた。

実施例3. ウェスタン分析

APPにはヘパリン結合部位があることが知られているので、まず培養上清中の分泌型APPをヘパリン-Sepharose（ファルマシア製）を用いたバッチ法により濃縮し、そのサンプルを用いてウェスタン分析を行った。すなわち、各培養上清液は1500回転5分間遠心後、ヘパリン-Sepharoseと4℃、2時間インキュベートした。

ヘパリン-SepharoseはPBSにより洗浄した後、1.5M NaCl/PBS溶液を用いて結合した蛋白を溶出させた。溶出蛋白に2倍濃度のサンプルバッファー（70mMトリスpH6.7、20%

グリセロール、5 % 2-メルカプトエタノール、2 % SDS) を等量加え、100 °C 5 分間処理した後、SDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行った。

泳動後PVDF-Plus メンブレン (フナコシ製) にブロットし、一次抗体と反応させた後、ビオチン化した各二次抗体 (フナコシ製) とインキュベートし、Vectastainエリートキット (フナコシ製) を用い4-クロルナフトール (和光純薬工業製) を基質として発色させた。

一次抗体としては、抗APPN末端抗体、sAPP α のC末端16アミノ酸を抗原としたウサギ抗血清である2570抗体、及びsAPP β のC末端7アミノ酸を抗原として取得したウサギ抗血清である2560、2561抗体を用いた。

なお、抗sAPP β 抗体 (2560抗体、2561抗体) は、sAPP β のC末端7アミノ酸 (GluIleSerGluValLysMet、配列番号: 3) のN末端部位にキャリアー蛋白としてKLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) を融合させ、アジュバントと混ぜた後にウサギに免疫することにより作成した。

また抗sAPP α 抗体 (2570抗体) は、抗sAPP β 抗体の場合と同様にsAPP α のC末端16アミノ酸 (Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys、配列番号: 4) にKLHを結合させ、ウサギに免疫することにより作成した。2570抗体と2560及び2561抗体は、分子量のわずかに違うsAPP α とsAPP β と考えられるバンドをそれぞれ特異的に認識し、免疫染色しわけることが確認されている。

実施例4. 分泌型APPのウェスタンブロット分析

巨核芽球系細胞およびAPP発現クローンMK/AP8, MK/AP9細胞を、10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640中で3~4日培

養した培養上清についてウェスタン分析した結果を図2に示す。各レーンには約600 μ l相当の培養上清を用いている。

一次抗体としてレーン1～3には2561抗体 (anti-sAPP β) を、レーン4～6には抗APPN末抗体を、レーン7～9には2570抗体 (anti-sAPP α) を用いた。

レーン1、4、7は巨核芽球系細胞の、レーン2、5、8はMK/AP8細胞の、レーン3、6、9はMK/AP9細胞の結果を示す。図2より明らかなように巨核芽球系細胞ではsAPPは検出されず、APP発現クローン細胞でのみ分子量約100～120KDのsAPP α のシングルバンドが検出された。一方sAPP β についてはどの細胞にも検出されなかった。

実施例5. ホルボールエステルの作用

MK/AP8細胞を6穴培養プレートに 3×10^5 個培養し、ホルボールエステル (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate、シグマ製) を100 nM添加した。培養液は3日おきに交換し、ホルボールエステルは6日間作用させた。培養6、12、17、21、24日目の培養上清についてウェスタン分析した結果を図3Aに示す。各レーンには約250 μ l相当の培養上清を用いている。一次抗体としてレーン1～5には2561抗体を、レーン6～10には2570抗体を用いた。それぞれ左のレーンより培養6、12、17、21及び24日目の結果を示す。

ホルボールエステルを作用させることにより培養12日目よりsAPP α と同時にsAPP β が検出された。同様の実験をAPP/NL発現クローンMK/NL2細胞、およびMK/NL10細胞について行った結果を図3Bに示す。この実験ではホルボールエステルを12日間作用させた。各レーンには約125 μ l相当の培養上清を用いている。レーン1～2には2561抗体を、レーン3～4には2570抗体を用いた。

それぞれ左のレーンがMK/NL2細胞の結果を示す。MK/N

L細胞の場合も同様にホルボールエステルを作用させることにより sAPP β が検出され、その量はMK/AP8細胞よりも多かった。

実施例6. エンザイムイムノアッセイ

各細胞の培養上清中の分泌型APPについては、サンドイッチ型のエンザイムイムノアッセイによる半定量的な測定を行った。すなわち、まず96穴イムノプレート（ナルゲ ヌンク製）を、2560抗体あるいは2570抗体（5000ナノグラム／ウェル）と4℃にて一晩インキュベートすることにより抗体のコーティングを行った。次にプレートは、PBSで洗浄した後25%ブロックエースと7～10時間インキュベートすることによりブロッキングを行った。

そして各培養上清サンプル（40 μ ）および抗APP N末抗体（最終500倍希釈）を加え4℃にて一晩インキュベートした。さらにプレートはPBSで洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体（バイオソース製）と室温にて1時間インキュベートした後、TMBマイクロウエル ペルオキシダーゼ キットシステム（フナコシ製）にて室温10分間発色させ、マイクロプレートリーダー（バイオ ラット製）を用いて450nmの吸光度の測定を行った。なお2560抗体と2570抗体は、それぞれsAPP β あるいはsAPP α のC末端5アミノ酸を結合させたアフィニティーカラム（HyTrap, ファルマシア製）を用いて精製したものを使用した。

実施例7. エンザイムイムノアッセイによる分泌型APPの定量

APP発現クローンSH-SY5Y/AP4細胞を、10%ウシ胎児血清を含むDMEM/F-12中で3日間培養した培養上清について、分泌型APPのエンザイムイムノアッセイを行った結果を図4に示す。培養上清は、10%ウシ胎児血清を含むDMEM/F-12で希釈した後に測定を行った。sAPP α 、sAPP β ともに約3000倍希釈より吸光度の上昇がみられ、100倍希釈以上の濃度ではほぼプラトーに達

し、このアッセイシステムによりそれぞれの分泌型APP が高感度に測定できることが判明した。

次に、図3 で用いたホルボールエステルを作用させたMK/AP8細胞の培養上清について、エンザイムイムノアッセイを行った結果を図5 に示す。2570抗体については培養液で100 倍希釈したサンプルを、また2560抗体については原液と培養液で10倍希釈したサンプルを用いて測定した。日数0 のデータはホルボールエステルを作用させていないMK/AP8細胞の培養上清の結果である。エンザイムイムノアッセイでもMK細胞ではsAPP β は検出されずsAPP α のみが検出された。さらにホルボールエステルを作用させることによりsAPP β が検出されるようになった。

本来APP を生成しないことが知られていた巨核芽球系細胞にAPP を強制発現させ、その代謝を調べた。巨核芽球系細胞ではAPP は α -セクレターゼでのみ切断を受け、 β -セクレターゼでは切断されないことが、ウエスタン分析およびエンザイムイムノアッセイの両方の解析法により判明した。

通常の細胞にAPP を強制発現させた場合は、APP は α -セクレターゼと β -セクレターゼの両方で代謝を受けることが報告されており、その意味において本発明の細胞株は非常にユニークであると考えられる。

なお、得られた巨核芽球系細胞株MK/AP8は、平成10年（1998年）3月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-6287として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

参考例

本実験に用いたエンザイムイムノアッセイが高感度であったため、このアッセイシステムと、APP を強制発現させた本発明の細胞株

を利用することにより、 β -セクレターゼのクローニングが可能である。すなわち、 β -セクレターゼが発現していると考えられるヒト脳、あるいはS H-S Y5 Y細胞のmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成する。

pCEP4ベクターを細胞内での発現ベクターとして用い、このベクターに作成したcDNAライブラリーを組み込む。作成したベクターはコンピテント細胞に導入し、1プール当たり約50クローンを含むE. coliのプールを96穴のプレートを用いて作成する。APPを発現している本発明の細胞株を96穴のプレートに培養し、各2~4プールのE. coliより調整したDNAを導入する。

2~3日後の各細胞培養の上清についてsAPP β のエンザイムイムノアッセイを行い、ポジティブなプールを検出する。得られたポジティブなcDNAのプールよりcDNAのクローンを作成し、同様の操作を繰り返すことにより β -セクレターゼをクローニングを進めることができる。

またホルボールエステルにより巨核芽球系細胞が分化誘導を受けることが知られていることより、ホルボールエステルにより巨核芽球系細胞でのAPPの代謝が変化するかどうかを検討した。その結果ホルボールエステル処理することにより、APPを強制発現させた巨核芽球系細胞でもsAPP β が生成するようになることが判明した。この事実に基づき、本発明の細胞株は β -セクレターゼのクローニングに利用できる。すなわち、ホルボールエステルにより β -セクレターゼが誘導されたと考え、ディファレンシャル ディスプレイ法等によりクローニングを進めることが可能になると考えられる。

産業上の利用可能性

細胞株にAPP遺伝子を導入することにより、 β -セクレターゼ活

性を発現しない細胞株が樹立された。本細胞株は、 β -セクレターゼの遺伝子を単離するために有用である。また、本細胞株を用いて β -セクレターゼの遺伝子をクローニングする方法が提供される。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1) 表示：MK/AP8

寄託番号：FERM BP-6287

寄託日：1998年3月9日

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 3 3 5 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

AGTTTCCTCG GCAGCGGTAG GCGAGAGCAC GCGGAGGAGC GTGCGGGGG GCCCGGGAG 60
 ACGGCGGGCG TGGCGGCGCG GGCAGAGCAA GGACGCGGCG GATCCCACTC GCACAGCAGC 120
 GCACTCGGTG CCCC CGCAG GGTGCGG ATG CTG CCC GGT TTG GCA CTG CTC CTG 174
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu

5

CTG GCC GCC TGG ACG GCT CGG GCG CTG GAG GTA CCC ACT GAT GGT AAT 222
 Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn
 10 15 20 25
 GCT GGC CTG CTG GCT GAA CCC CAG ATT GCC ATG TTC TGT GGC AGA CTG 270
 Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu
 30 35 40
 AAC ATG CAC ATG AAT GTC CAG AAT GGG AAG TGG GAT TCA GAT CCA TCA 318
 Asn Met His Met Asn Val Gln Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser
 45 50 55
 GGG ACC AAA ACC TGC ATT GAT ACC AAG GAA GGC ATC CTG CAG TAT TGC 366
 Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys
 60 65 70

3 6

GCA GAT GGG AGT GAA GAC AAA GTA GTA GAA GTA GCA GAG GAG GAA GAA	846
Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu	
220 225 230	
GTG GCT GAG GTG GAA GAA GAA GAA GCC GAT GAT GAC GAG GAC GAT GAG	894
Val Ala Glu Val Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu	
235 240 245	
GAT GGT GAT GAG GTA GAG GAA GAG GCT GAG GAA CCC TAC GAA GAA GCC	942
Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala	
250 255 260 265	
ACA GAG AGA ACC ACC ACC ATT GCC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACA GAG	990
Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu	
270 275 280	
TCT GTG GAA GAG GTG GTT CGA GTT CCT ACA ACA GCA GCC AGT ACC CCT	1038
Ser Val Glu Glu Val Val Arg Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro	
285 290 295	
GAT GCC GTT GAC AAG TAT CTC GAG ACA CCT GGG GAT GAG AAT GAA CAT	1086
Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His	
300 305 310	
GCC CAT TTC CAG AAA GCC AAA GAG AGG CTT GAG GCC AAG CAC CGA GAG	1134
Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu	
315 320 325	
AGA ATG TCC CAG GTC ATG AGA GAA TGG GAA GAG GCA GAA CGT CAA GCA	1182
Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala	
330 335 340 345	
AAG AAC TTG CCT AAA GCT GAT AAG AAG GCA GTT ATC CAG CAT TTC CAG	1230
Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln	
350 355 360	

GAG AAA GTG GAA TCT TTG GAA CAG GAA GCA GCC AAC GAG AGA CAG CAG 1278
 Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln
 365 370 375
 CTG GTG GAG ACA CAC ATG GCC AGA GTG GAA GCC ATG CTC AAT GAC CGC 1326
 Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg
 380 385 390
 CGC CGC CTG GCC CTG GAG AAC TAC ATC ACC GCT CTG CAG GCT GTT CCT 1374
 Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro
 395 400 405
 CCT CGG CCT CGT CAC GTG TTC AAT ATG CTA AAG AAG TAT GTC CGC GCA 1422
 Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala
 410 415 420 425
 GAA CAG AAG GAC AGA CAG CAC ACC CTA AAG CAT TTC GAG CAT GTG CGC 1470
 Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg
 430 435 440
 ATG GTG GAT CCC AAG AAA GCC GCT CAG ATC CGG TCC CAG GTT ATG ACA 1518
 Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr
 445 450 455
 CAC CTC CGT GTG ATT TAT GAG CGC ATG AAT CAG TCT CTC TCC CTG CTC 1566
 His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu
 460 465 470
 TAC AAC GTG CCT GCA GTG GCC GAG GAG ATT CAG GAT GAA GTT GAT GAG 1614
 Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu
 475 480 485
 CTG CTT CAG AAA GAG CAA AAC TAT TCA GAT GAC GTC TTG GCC AAC ATG 1662
 Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met
 490 495 500 505

ATT AGT GAA CCA AGG ATC AGT TAC GGA AAC GAT GCT CTC ATG CCA TCT 1710
 Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser
 510 515 520
 TTG ACC GAA ACG AAA ACC ACC GTG GAG CTC CTT CCC GTG AAT GGA GAG 1758
 Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu
 525 530 535
 TTC AGC CTG GAC GAT CTC CAG CCG TGG CAT TCT TTT GGG GCT GAC TCT 1806
 Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser
 540 545 550
 GTG CCA GCC AAC ACA GAA AAC GAA GTT GAG CCT GTT GAT GCC CGC CCT 1854
 Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro
 555 560 565
 GCT GCC GAC CGA GGA CTG ACC ACT CGA CCA GGT TCT GGG TTG ACA AAT 1902
 Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn
 570 575 580 585
 ATC AAG ACG GAG GAG ATC TCT GAA GTG AAG ATG GAT GCA GAA TTC CGA 1950
 Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg
 590 595 600
 CAT GAC TCA GGA TAT GAA GTT CAT CAT CAA AAA TTG GTG TTC TTT GCA 1998
 His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 605 610 615
 GAA GAT GTG GGT TCA AAC AAA GGT GCA ATC ATT GGA CTC ATG GTG GGC 2046
 Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
 620 625 630
 GGT GTT GTC ATA GCG ACA GTG ATC GTC ATC ACC TTG GTG ATG CTG AAG 2094
 Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys
 635 640 645

AAG AAA CAG TAC ACA TCC ATT CAT CAT GGT GTG GTG GAG GTT GAC GCC 2142
Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala
650 655 660 665

GCT GTC ACC CCA GAG GAG CGC CAC CTG TCC AAG ATG CAG CAG AAC GGC 2190
Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly
670 675 680

TAC GAA AAT CCA ACC TAC AAG TTC TTT GAG CAG ATG CAG AAC 2232
Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
685 690 695

TAGACCCCCG CCACAGCAGC CTCTGAAGTT GGACAGCAAA ACCATTGCTT CACTACCCAT 2292
CGGTGTCCAT TTATAGAATA ATGTGGAAG AAACAAACC GTTTTATGAT TTA CTCTATTA 2352
TCGCCTTTTG ACAGCTGTGC TGTAACACAA GTAGATGCCT GAACTTGAAT TAATCCACAC 2412
ATCAGTAATG TATTCTATCT CTCTTTACAT TTTGGTCTCT ATACTACATT ATTAATGGGT 2472
TTTGTGTACT GTAAAGAATT TAGCTGTATC AAAGTAGTGC ATGAATAGAT TCTCTCCTGA 2532
TTATTTATCA CATAGCCCCT TAGCCAGTTG TATATTATTC TTGTGGTTTG TGACCCAATT 2592
AAGTCCTACT TTACATATGC TTTAAGAATC GATGGGGGAT GCTTCATGTG AACGTGGGAG 2652
TTCAGCTGCT TCTCTGCCT AAGTATTCCT TTCCTGATCA CTATGCATTT TAAAGTTAAA 2712
CATTTTAAAG TATTTAGAT GCTTTAGAGA GATTTT TTTT CCATGACTGC ATTTTACTGT 2772
ACAGATTGCT GCTTCTGCTA TATTTGTGAT ATAGGAATTA AGAGGATACA CACGTTTGTT 2832
TCTTCGTGCC TGTTTTATGT GCACACATTA GGCATTGAGA CTTCAAGCTT TTCTTTTTTT 2892
GTCCACGTAT CTTTGGGTCT TTGATAAAGA AAAGAATCCC TGTTCAATTGT AAGCACTTTT 2952
ACGGGGCGGG TGGGGAGGGG TGCTCTGCTG GTCTTCAATT ACCAAGAATT CTCCAAAACA 3012
ATTTTCTGCA GGATGATTGT ACAGAATCAT TGCTTATGAC ATGATCGCTT TCTACACTGT 3072
ATTACATAAA TAAATTAAAT AAAATAACCC CGGGCAAGAC TTTTCTTTGA AGGATGACTA 3132
CAGACATTAA ATAATCGAAG TAATTTTGGG TGGGGAGAAG AGGCAGATTC AATTTTCTTT 3192

AACCAGTCTG AAGTTTCATT TATGATACAA AAGAAGATGA AAATGGAAGT GGCAATATAA 3252
GGGGATGAGG AAGGCATGCC TGGACAAACC CTTCTTTTAA GATGTGTCTT CAATTTGTAT 3312
AAAATGGTGT TTTCATGTAA ATAAATACAT TCTTGGAGGA GC 3354

配列番号 : 2

配列の長さ : 42

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

40

配列番号 : 3

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Glu Ile Ser Glu Val Lys Met

5

配列番号 : 4

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

配列番号：5

配列の長さ：6 9 5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

5

10

15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro

20

25

30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln

35

40

45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp

50

55

60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu

65

70

75

80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn

85

90

95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val

100

105

110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu

115

120

125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335

Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365
 Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
 370 375 380
 Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
 405 410 415
 Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
 420 425 430
 Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
 435 440 445
 Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
 450 455 460
 Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
 465 470 475 480
 Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
 485 490 495
 Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
 500 505 510
 Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
 515 520 525
 Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
 530 535 540

Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
 545 550 555 560
 Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
 565 570 575
 Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
 580 585 590
 Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 595 600 605
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 610 615 620
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
 625 630 635 640
 Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
 645 650 655
 His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
 660 665 670
 His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
 675 680 685
 Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 690 695

請 求 の 範 囲

1. (1) β -アミロイド前駆体蛋白質(APP)を産生し、(2) α -セクレターゼ活性を発現し、且つ(3)無刺激下で β -セクレターゼ活性を発現しない細胞株。

2. 刺激下で検出可能な β -セクレターゼ活性を発現する請求項1に記載の細胞株。

3. 動物細胞である請求項1又は2に記載の細胞株。

4. ヒト巨核芽球系細胞由来である請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞株。

5. FERM BP-6287として寄託されている請求項4に記載の細胞株。

6. (1)請求項1に記載の細胞株にDNAライブラリーを導入し、(2)導入したDNAを発現させ、(3) β -セクレターゼ活性を発現する細胞を選択し、(4)選択された細胞から β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法。

7. 導入するDNAライブラリーがcDNAライブラリーである、請求項6に記載のクローニング方法。

8. cDNAライブラリーが哺乳動物細胞由来cDNAライブラリーである、請求項7に記載のクローニング方法。

9. cDNAライブラリーが脳由来cDNAライブラリーである、請求項8に記載のクローニング方法。

10. (1)無刺激下で請求項1に記載の細胞からDNAを調製し、(2)刺激下で請求項1に記載の細胞からDNAを調製し、(3)(1)で得られたDNAに存在せず且つ(2)で得られたDNAに存在するDNAクローンを得、(4) β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードす

るDNAを単離する、ことを含んでなる β -セクレターゼをコードするDNAのクローニング方法。

11. 細胞から調製するDNAがcDNAである、請求項10に記載のクローニング方法。

12. 請求項6または10に記載のクローニング方法によって得られる β -セクレターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

Fig.1

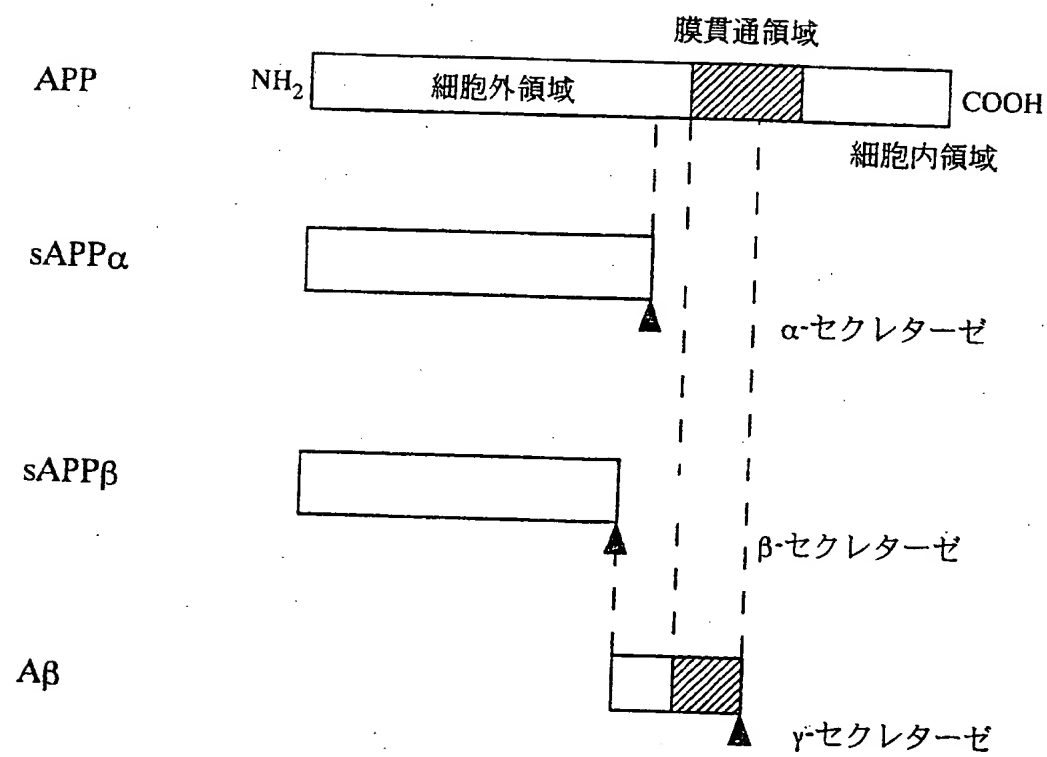


Fig. 2

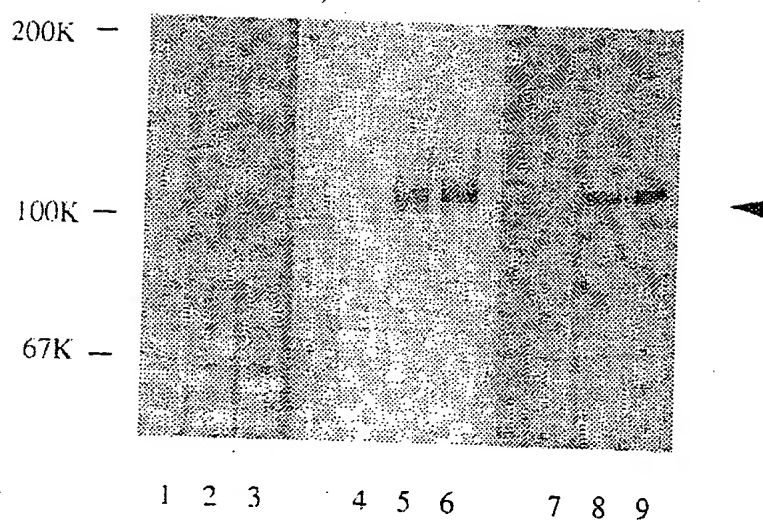
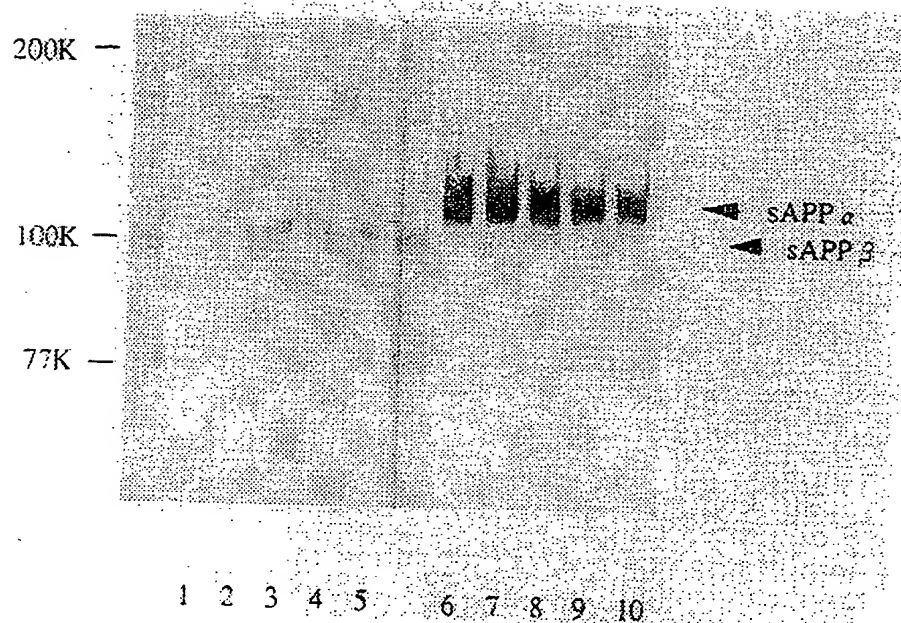


Fig.3

A



B

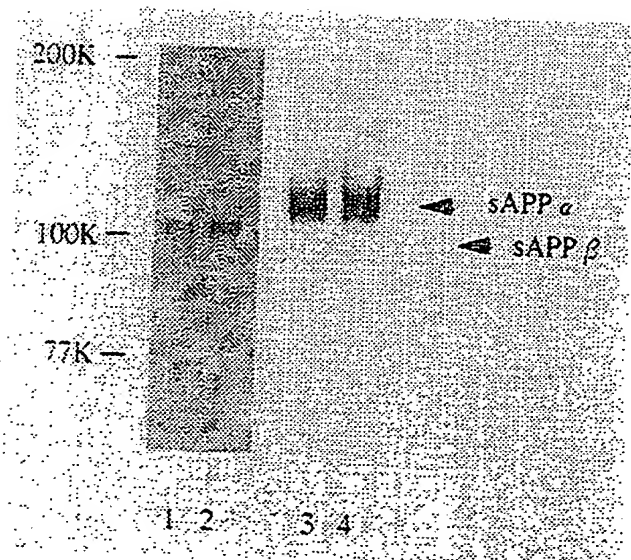


Fig.4

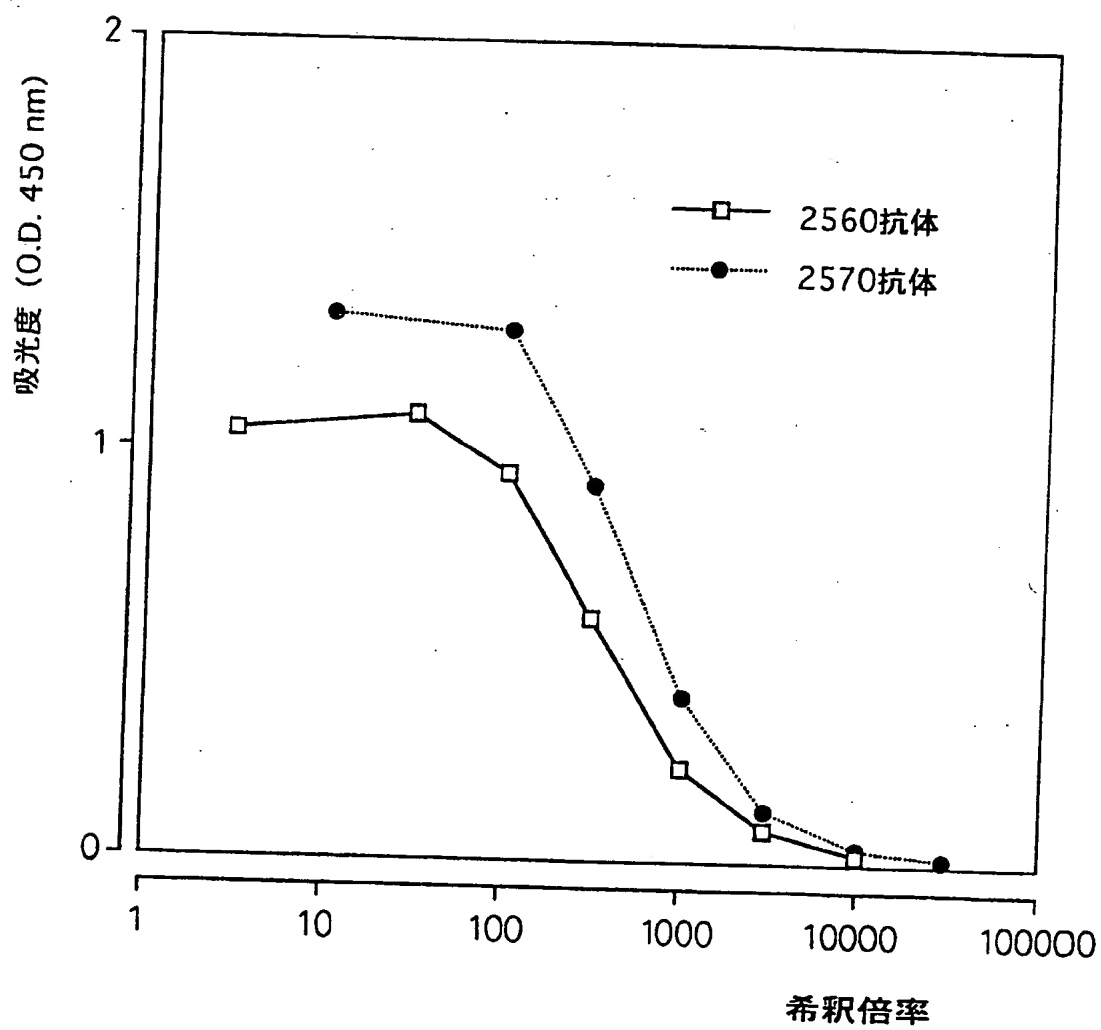
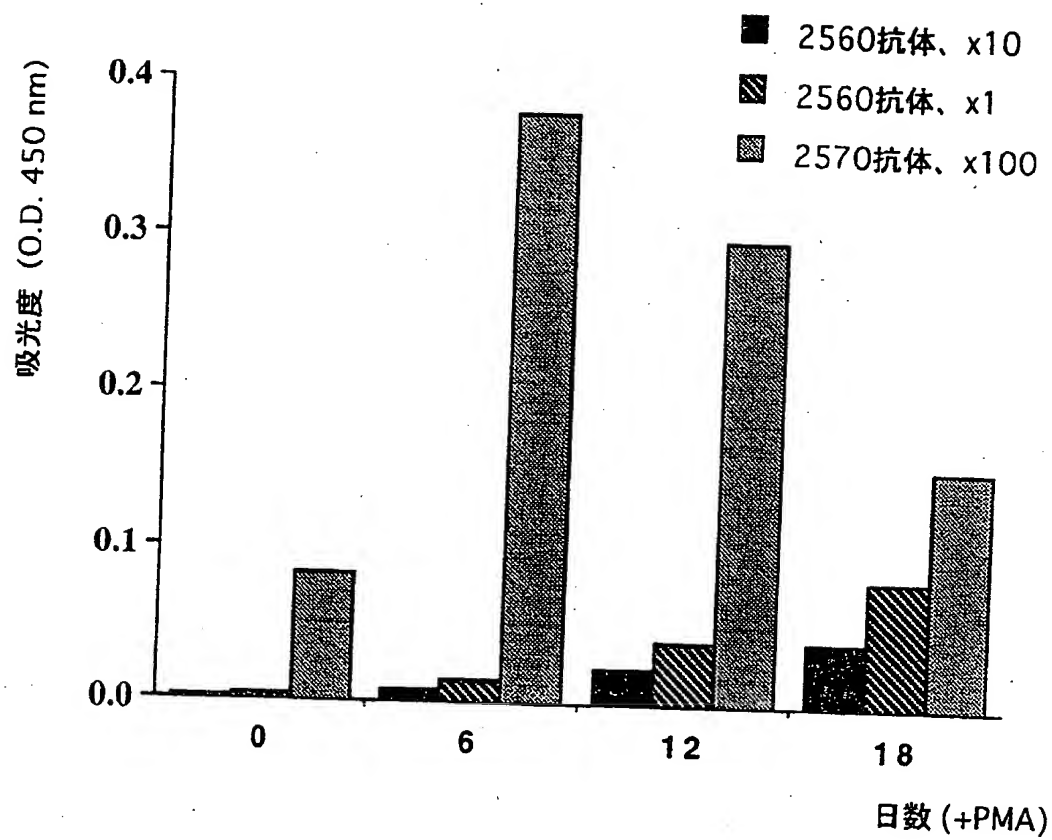


Fig. 5



SEQUENCE LISTING

- <110> SUNTORY LIMITED
 <120> Cell strain not expressing β -secretase activity
 <130> F945
 <150> JP 10-101821
 <151> 1998-03-31
 <160> 5
 <210> 1
 <211> 3354
 <212> DNA
 <213> Homosapiens
 <223> Nucleotide sequence of cDNA coding for beta-amyloid precursor protein

<400> 1

agtttcctcg gcagcggtag gcgagagcac gcggaggagc gtgcgcgggg gccccgggag 60
 acggcggcgg tggcggcgcg ggcagagcaa ggacgcggcg gatccactc gcacagcagc 120
 gcactcggtg ccccgcgag ggtcgcg atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg 174
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu

5

ctg gcc gcc tgg acg gct cgg gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat 222
 Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn
 10 15 20 25
 gct ggc ctg ctg gct gaa ccc cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg 270
 Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu
 30 35 40

aac atg cac atg aat gtc cag aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca	318
Asn Met His Met Asn Val Gln Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser	
45 50 55	
ggg acc aaa acc tgc att gat acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc	366
Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys	
60 65 70	
caa gaa gtc tac cct gaa ctg cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac	414
Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn	
75 80 85	
caa cca gtg acc atc cag aac tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc	462
Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys	
90 95 100 105	
aag acc cat ccc cac ttt gtg att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag	510
Lys Thr His Pro His Phe Val Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu	
110 115 120	
ttt gta agt gat gcc ctt ctc gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac	558
Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His	
125 130 135	
cag gag agg atg gat gtt tgc gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc	606
Gln Glu Arg Met Asp Val Cys Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val	
140 145 150	
gcc aaa gag aca tgc agt gag aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc	654
Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly	
155 160 165	
atg ttg ctg ccc tgc gga att gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg	702
Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val	
170 175 180 185	

tgt tgc cca ctg gct gaa gaa agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg	750
Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala	
190 195 200	
gag gag gat gac tcg gat gtc tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat	798
Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr	
205 210 215	
gca gat ggg agt gaa gac aaa gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa	846
Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu	
220 225 230	
gtg gct gag gtg gaa gaa gaa gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag	894
Val Ala Glu Val Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu	
235 240 245	
ggt ggt gat gag gta gag gaa gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc	942
Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala	
250 255 260 265	
aca gag aga acc acc agc att gcc acc acc acc acc acc acc aca gag	990
Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu	
270 275 280	
tct gtg gaa gag gtg gtt cga gtt cct aca aca gca gcc agt acc cct	1038
Ser Val Glu Glu Val Val Arg Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro	
285 290 295	
gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat gag aat gaa cat	1086
Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His	
300 305 310	
gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc aag cac cga gag	1134
Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu	
315 320 325	

aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca gaa cgt caa gca 1182
 Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala
 330 335 340 345
 aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc cag cat ttc cag 1230
 Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln
 350 355 360
 gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac gag aga cag cag 1278
 Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln
 365 370 375
 ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg ctc aat gac cgc 1326
 Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg
 380 385 390
 cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg cag gct gtt cct 1374
 Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro
 395 400 405
 cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag tat gtc cgc gca 1422
 Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala
 410 415 420 425
 gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc gag cat gtg cgc 1470
 Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg
 430 435 440
 atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc cag gtt atg aca 1518
 Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr
 445 450 455
 cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct ctc tcc ctg ctc 1566
 His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu
 460 465 470

tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat gaa gtt gat gag	1614
Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu	
475 480 485	
ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc ttg gcc aac atg	1662
Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met	
490 495 500 505	
att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct ctc atg cca tct	1710
Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser	
510 515 520	
ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc gtg aat gga gag	1758
Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu	
525 530 535	
ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt ggg gct gac tct	1806
Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser	
540 545 550	
gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt gat gcc cgc cct	1854
Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro	
555 560 565	
gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct ggg ttg aca aat	1902
Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn	
570 575 580 585	
atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat gca gaa ttc cga	1950
Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg	
590 595 600	
cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gca	1998
His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala	
605 610 615	

gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga ctc atg gtg ggc 2046
 Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
 620 625 630
 ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg gtg atg ctg aag 2094
 Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys
 635 640 645
 aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg gag gtt gac gcc 2142
 Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala
 650 655 660 665
 gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg cag cag aac ggc 2190
 Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly
 670 675 680
 tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg cag aac 2232
 Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 685 690 695
 tagacccccg ccacagcagc ctctgaagtt ggacagcaaa accattgctt cactacccat 2292
 cgggtgtccat ttatagaata atgtgggaag aaacaaaccc gttttatgat ttactcatta 2352
 tcgccttttg acagctgtgc tgtaacacaa gtagatgcct gaacttgaat taatccacac 2412
 atcagtaatg tattctatct ctctttacat tttggtctct atactacatt attaatgggt 2472
 tttgtgtact gtaaagaatt tagctgtatc aaactagtgc atgaatagat tctctcctga 2532
 ttatttatca catagcccct tagccagtig tatattattc ttgtggtttg tgaccaat 2592
 aagtcctact ttacatatgc tttagaatc gatgggggat gcttcatttg aacgtgggag 2652
 ttcagctgct tctcttgccct aagtattcct ttccigtatca ctatgcattt taaagttaa 2712
 catttttaag tatttcagat gctttagaga gattttttt ccatgactgc attttactgt 2772
 acagattgct gcttctgcta tatttgtgat ataggaatta agaggataca cacgtttgtt 2832
 tcttcgtgcc tgttttatgt gcacacatta ggcatgaga cttcaagctt ttctttttt 2892
 gtccacgtat ctttgggtct ttgataaaga aaagaatccc tgttcattgt aagcactttt 2952

acggggcggg tggggagggg tgctctgctg gtcttcaatt accaagaatt ctccaaaaca 3012
 attttctgca ggatgattgt acagaatcat tgcttatgac atgacgctt tctacactgt 3072
 attacataaa taaattaaat aaaataaccc cgggcaagac ttttcttga aggatgacta 3132
 cagacattaa ataatcgaag taattttggg tggggagaag aggcagattc aattttcttt 3192
 aaccagtctg aagtttcatt tatgatacaa aagaagatga aaatggaagt ggcaatataa 3252
 ggggatgagg aaggcatgcc tggacaaacc cttcttttaa gatgtgtctt caattgtat 3312
 aaaatggtgt tttcatgtaa ataaatacat tcttgagga gc 3354

<210> 2

<211> 42

<212> PRT

<213> Homosapiens

<223> A part of amino acid sequence of beta-amyloid precursor
 protein

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

40

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> An antigenic sequence for preparation of anti- sAPP β a
 ntibody

<400> 3

Glu Ile Ser Glu Val Lys Met

5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> An antigenic sequence for preparation of anti- sAPP α
antibody

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

<210> 5

<211> 695

<212> PRT

<213> Homosapiens

<223> Amino acid sequece of beta-amyloid precursor protein

<400> 5

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

5

10

15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro

20

25

30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln

35

40

45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp

50

55

60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335
 Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365
 Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
 370 375 380
 Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
 405 410 415
 Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
 420 425 430
 Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
 435 440 445
 Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
 450 455 460
 Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
 465 470 475 480

Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
 485 490 495
 Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
 500 505 510
 Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
 515 520 525
 Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
 530 535 540
 Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
 545 550 555 560
 Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
 565 570 575
 Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
 580 585 590
 Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 595 600 605
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 610 615 620
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
 625 630 635 640
 Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
 645 650 655
 His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
 660 665 670
 His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
 675 680 685

WO 99/51752

PCT/JP99/01701

Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn

690

695

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/57, C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/00-15/90, C12N5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochimica et Biophysica Acta, 1359, 1997, p.110-122 Wei Zhang et al., "Characterization of beta-amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases"	1-12
A	The Journal of Biological Chemistry, 270(6), Feb. 1996, p.2419-2422 Sukanto Sinha et al., "Cell-type and Amyloid Precursor Protein-type Specific Inhibition of Abeta Release by Bafilomycin A1, a Selective Inhibitor of Vacuolar ATPases"	1-12
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199598316363, Arzneimittelforschung, 45(3A), 1995, p.435-438 Wurtman, R.J. et al., "Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor by first messengers: A novel potential approach for the treatment of Alzheimer's disease"	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 May, 1999 (25. 05. 99)

Date of mailing of the international search report
8 June, 1999 (08. 06. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01701

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199799521452, Molecular Medicine (New York), 3(3), 1997, p.204-211 Koo Edward, H., "Phorbol esters affect multiple steps in beta-amyloid precursor protein trafficking and amyloid beta-protein production"	1-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/01701

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/57, C12N 5/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/00-15/90, C12N 5/00-5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochimica et Biophysica Acta, 1359, 1997, p. 110-122 Wei Zhang et al., "Characterization of beta-amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases"	1-12
A	The Journal of Biological Chemistry, 270(6), Feb. 1996, p. 2419-2422 Sukanto Sinha et al., "Cell-type and Amyloid Precursor Protein-type Specific Inhibition of Abeta Release by Bafilomycin A1, a Selective Inhibitor of Vacuolar ATPases"	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.05.99

国際調査報告の発送日 08.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199598316363, Arzneimittel-Forschung, 45(3A), 1995, p. 435-438 Wurtman, R. J. et al., "Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor by first messengers: A novel potential approach for the treatment of Alzheimer's disease"	1-12
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199799521452, Molecular Medicine (New York), 3(3), 1997, p. 204-211 Koo Edward, H., "Phorbol esters affect multiple steps in beta-amyloid precursor protein trafficking and amyloid beta-protein production"	1-12